

# **Autolytische Salmonellen als Vektoren für die orale genetische Vakzinierung**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemiker Holger Lößner  
geboren am 4. September 1969 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter :      1. Prof. Dr. Detlev H. Krüger  
                     2. Prof. Dr. Thomas F. Meyer  
                     3. Priv. Doz. Dr. Dr. Carlos A. Guzman

Tag der mündlichen Prüfung : 27. November 2003

## 1 Zusammenfassung

Die Entwicklung einer effektiven, oral verabreichbaren DNA-Vakzine gegen Infektionskrankheiten oder Tumorerkrankungen auf der Basis rekombinanter, attenuierter Salmonellen ist eine vielversprechende Alternative zu bisherigen parenteralen Strategien der genetischen Vakzinierung. Vor kurzem wurde das Konzept der Salmonellen-vermittelten DNA-Vakzinierung mit dem *aroA*-attenuierten *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium-Impfstamm SL7207 in Mäusen etabliert. Bakterien dieses Stammes passieren nach der oralen Gabe das Darmepithel, infizieren professionelle antigenpräsentierende Zellen des darmassoziierten Lymphgewebes und persistieren mehrere Wochen in den Peyer-Plaques, den mesenterischen Lymphknoten, in der Milz sowie der Leber. Wie der Transfer der Plasmid-DNA aus den Bakterien in den Kern der Wirtszellen erfolgt, wird bisher nicht verstanden. Voraussetzungen für die Transfektion der infizierten Zelle sind die Freisetzung intakter Plasmid-DNA aus dem bakteriellen Vektor, der Austritt der DNA aus dem phagosomalen Kompartiment sowie die effiziente Passage der DNA durch das Zytoplasma in den Zellkern. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Optimierung einer Salmonellen-DNA-Vakzine für die orale Route, geeignet für die Induktion potenter humoraler und zellulärer Immunantworten.

Die Erhaltung herkömmlicher eukaryontischer Expressionsplasmide durch Salmonellen erfolgt in hoher Molekülzahl. Ohne den selektiven Druck durch Antibiotika gehen diese Plasmide jedoch schnell verloren. Die Belastung des bakteriellen Stoffwechsel durch die Plasmidreplikation führt zu einer verminderten Invasivität der plasmidtragenden Salmonellen gegenüber plasmidfreien Bakterien. Innerhalb der infizierten Wirtszelle wird die durch Salmonellen eingeschleuste Plasmid-DNA im Laufe eines Tages abgebaut, ohne die Zelle zu transfizieren. Die Behandlung infizierter Zellen mit Antibiotika ist nicht ausreichend, um intrazelluläre Bakterien effektiv zu lysieren und den DNA-Transfer in den Zellkern auszulösen. Weitere Experimente unter Verwendung verschiedener attenuierter Salmonellen-Impfstämme sowie Säugerzellen unterschiedlicher Herkunft erbrachten keinen Nachweis für einen Salmonellen-vermittelten DNA-Transfer *in vitro*. Die kontinuierliche Sezernierung von Plasmiden als filamentöse Phagenpartikel aus Salmonellen erfordert nicht die bakterielle Lyse. Im Gegensatz zu *Escherichia coli* bleibt jedoch in den Salmonellen die Verpackung des eukaryontischen Expressionsplasmids hinter der Verpackung des Helferphagens zurück. Durch phagensekretierende Salmonellen gelangen nur wenige Phagenpartikel in die infizierte Wirtszelle. Diese Partikel vermitteln keine Transgenexpression im Gegensatz zu liposomal transfizierten Partikeln.

Auf der Grundlage des Zwei-Phasen-Expressionssystems (ZPES) wurde in dieser Arbeit ein neuartiges autolytisches Salmonellen-DNA-Vektorsystem etabliert. Die Expression der Lysedeterminante und damit die Induktion der bakteriellen Lyse wird durch die spontane Inversion eines definierten chromosomalen DNA-Fragments in einzelnen Zellen der bakteriellen Gesamtpopulation ausgelöst. Die Frequenz der Inversionsereignisse wird dabei durch die Konzentration der Rekombinase des ZPES bestimmt und ist regulierbar. Die Lysedeterminante

Gen-E des Bakteriophagen  $\phi$ X174 vermittelt vor dem Hintergrund eines Salmonellen-ZPES-Stammes die effiziente Freisetzung von Plasmid-DNA und Proteinen aus lysierenden Bakterien in der wachsenden Kultur. Die Integration einer konstitutiven Expressionskassette für Listeriolysin O (LLO) in diesen Stamm führt zur Freisetzung von aktivem LLO parallel zur Plasmid-DNA aus lysierenden Bakterien. Die elektronenmikroskopische Untersuchung infizierter COS7-Zellen zeigte, dass diese LLO-Freisetzung zur Zerstörung des phagosomalen Kompartimentes führt und somit der Zugang für Plasmid-DNA in das Zytoplasma eröffnet wird.

Das Lyseoperon des Bakteriophagen  $\lambda$  vermittelt die bakterielle Lyse nach einem anderen Mechanismus als Gen-E. Die stark lytische Determinante Mini- $\lambda$  wurde durch Deletion des Holin-Inhibitors des  $\lambda$ -Lyseoperons erzeugt. Autolytische Salmonellen, entweder basierend auf Gen-E oder Mini- $\lambda$ , wurden *in vitro* verglichen. Beide Determinanten vermitteln eine ähnlich starke bakterielle Lyse in der Kultur und sind funktional in infizierten COS7-Zellen. Zur Stabilisierung des autolytischen DNA-Vektorsystems wurden die Lysedeterminante und die eukaryontische Expressionskassette für das Hepatits-B-Oberflächenantigen (HBsAg) auf einem Plasmid kombiniert, jedoch scheiterte die zusätzliche Integration der LLO-Expressionskassette in diesen Vektor. Alternativ wurde eine Kassette zur konstitutiven Expression des Histon-ähnlichen Proteins aus *Thermotoga maritima* (TmHU) in den Plasmidvektor integriert. TmHU ist ein effizientes DNA-Transfektionsagenz in der Zellkultur und unterstützt potentiell die Passage freigesetzter Plasmid-DNA aus dem Phagosom durch das Zytoplasma in den Zellkern der Wirtszelle. Durch die TmHU-Expressionskassette wird außerdem die Stabilität des Plasmidsystems erhöht.

Die autolytischen Salmonellen-Vektoren wurden als orale HBsAg-DNA-Vakzine in Mäusen getestet. Im Gegensatz zu den nicht-lytischen sowie den schwach-lytischen Stämmen stimulierte der autolytische Stamm, basierend auf der Mini- $\lambda$ -Lysedeterminante vor dem Hintergrund des ZPES-Impfstammes mit erhöhter Inversionsfrequenz und mit der TmHU-Expressionskassette, eine potente HBsAg-spezifische Antikörperantwort sowie eine zytotoxische zelluläre Antwort. Bereits die einmalige orale Gabe dieser Impfbakterien induzierte eine höhere antigenspezifische Antikörperantwort, als die intramuskuläre Injektion der DNA-Vakzine. Im Vergleich zur intramuskulären Injektion genügte dafür die um ca. drei Größenordnungen geringere Plasmid-DNA-Menge der oralen Vakzine. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Konzept autolytischer Salmonellen stellt also eine neuartige, effiziente Strategie für den mukosalen DNA-Transfer dar. Darüber hinaus lassen sich autolytische Salmonellen möglicherweise auch als Vektoren für die Freisetzung therapeutischer Proteine einsetzen, beispielsweise in der Tumorthherapie. Die Übertragung des Konzeptes der Autolyse auf andere bakterielle Trägersysteme ist naheliegend und wird das Anwendungsspektrum autolytischer Vektoren vergrößern.

Schlagwörter :

Attenuierte Salmonellen, Autolyse, Filamentöse Bakteriophagen, HBsAg, Listeriolysin O, Orale DNA-Vakzine, Plasmid-DNA-Transfer, TmHU, Zwei-Phasen-Expressionssystem

## 2 Abstract

The development of an effective, oral DNA vaccine against infectious diseases or tumors based on recombinant attenuated *Salmonella* is a very promising alternative to common parenteral routes of genetic vaccination. Recently the concept of *Salmonella*-mediated genetic vaccination has been established in mice by using the *aroA*-attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain SL7207. Following oral uptake bacteria of this strain pass the intestinal epithelium, infect professional antigen presenting cells of the gut-associated lymphoid tissue and persist several weeks in Peyer patches, mesenteric lymph nodes, spleen and liver. The exact mechanism of DNA transfer from bacteria into the nucleus of the eukaryotic host cell is not known. Prerequisites for the transfection of infected cells are the release of intact plasmid DNA from the bacterial carrier, the release of DNA from the phagosomal compartment and the efficient passage of DNA through the cytoplasm into the nucleus. This work aimed at the improvement of an oral *Salmonella* DNA vaccine in order to elicitate potent antigen specific humoral and cellular immune responses.

Conventional eukaryotic expression plasmids are propagated by *Salmonella* at high copy number. Without antibiotic selection these plasmids are rapidly lost. Plasmid replication is a burden for the bacterial metabolism leading to reduced invasiveness of plasmid-containing bacteria in comparison to plasmidfree bacteria. Within the infected cell plasmid DNA introduced by *Salmonella* is degraded in the course of one day without having mediated transgene expression. Antibiotic treatment of infected cells was not sufficient to cause lysis of intracellular bacteria and in turn DNA transfer into the nucleus. Further experiments using differently attenuated *Salmonella* vaccine strains or mammalian cells of different origin did not yield proof of *Salmonella*-mediated DNA transfer *in vitro*. The continuous secretion of plasmids as filamentous phage particles by *Salmonella* does not require bacterial lysis. However, in *Salmonella* the packaging of the eukaryotic expression plasmid is lagging behind the packaging of the helper phage in contrast to *Escherichia coli*. Only few particles are transferred by phage secreting *Salmonella* into the host cell. These particles did not mediate transgene expression in contrast to liposomally transfected particles.

On the basis of the two-phase expression system (ZPES) in this work a novel autolytic *Salmonella* DNA carrier has been established. The expression of the lysis determinant is initiated by the spontaneous inversion of a defined chromosomal DNA fragment in some cells of the bacterial population. The inversion frequency is determined by the concentration of the ZPES-recombinase and can be regulated. The lysis determinant gene E of bacteriophage  $\phi$ X174 in the background of a ZPES vaccine strain mediates efficient release of plasmid DNA and proteins from lysing bacteria in a growing culture. The integration of a constitutive expression cassette for listeriolysin O (LLO) into this strain induces the release of active LLO in parallel to plasmid DNA from lysing bacteria. Electron-microscopic data suggest that this LLO release leads to disruption of the phagosomal compartment thereby giving plasmid DNA access into the host cell cytoplasm.

The lysis operon of bacteriophage  $\lambda$  causes bacterial lysis by a different mechanism as gene E. A highly lytic determinant, named Mini $\lambda$ , was generated by deletion of the operon holin inhibitor. Autolytic *Salmonella* strains with either gene E or Mini $\lambda$  were assayed *in vitro*. Both determinants are mediating a similar rate of lysis in culture and are functional inside infected COS7 cells. In order to stabilize the autolytic DNA vector system the lysis determinant was combined on one plasmid with the eukaryotic expression cassette for hepatitis B surface antigen (HBsAg). The integration of the LLO cassette on the same plasmid could not be achieved. Alternatively a constitutive expression cassette for the histon-like protein of *Thermotoga maritima* (TmHU) was integrated into the vector. TmHU is known to be an efficient DNA transfection agent in cell culture and may support the passage of plasmid DNA from the phagosome through the cytoplasm into the nucleus of the host cell. In addition the TmHU cassette improves the stability of the plasmid vector.

Autolytic *Salmonella* have been tested as an oral HBsAg DNA vaccine in mice. In contrast to non-lytic or slightly lytic strains the autolytic vaccine strain, based on the Mini $\lambda$  determinant in the background of the ZPES-strain with the higher inversion frequency and the TmHU cassette, stimulated a potent HBsAg-specific antibody response as well as a cytotoxic cellular response. Even after a single inoculation of the oral vaccine a higher specific antibody response was induced than with the conventional intramuscular DNA vaccine, despite the DNA dose of the oral vaccine was three orders of magnitude lower compared to the intramuscular injected vaccine. Therefore the concept of autolytic *Salmonella* carrier strains developed in this thesis is a novel efficient strategy for mucosal DNA delivery. Beyond autolytic *Salmonella* are promising carriers for the delivery of therapeutic proteins, e.g. in tumor therapy. The transfer of the concept to other bacterial carriers is self-evident and will widen the application field of autolytic vectors.

Keywords : attenuated *Salmonella*, autolysis, filamentous bacteriophage, HBsAg, listeriolysin O, oral DNA vaccine, plasmid DNA transfer, TmHU, two-phase expression system

---

# Inhalt

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
3.1	Vakzinierung .....	10
3.2	Genetische Vakzinierung .....	14
3.3	Rekombinante attenuierte Salmonellen als Träger heterologer Antigene .....	17
3.4	Salmonellen als Vektoren für die genetische Vakzinierung .....	22
3.5	Zielstellung .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>26</b>
4.1	Bakterienstämme und Bakteriophagen .....	26
4.1.1	Konstruktion des Stammes SL7207::VO170 .....	27
4.2	Säugerzelllinien .....	27
4.3	Versuchstiere .....	28
4.4	Nukleinsäuren .....	28
4.4.1	Oligonukleotide .....	28
4.4.2	Ausgangsplasmide und sonstige DNA .....	29
4.4.3	Übersicht klonierter Plasmide .....	30
4.4.3.1	Konstruktion der Reporterplasmide .....	32
4.4.3.2	Konstrukte des autolytischen Systems .....	32
4.4.3.3	Plasmide mit der eukaryontischen HBsAg-Expressionskassette .....	33
4.5	Enzyme, Antikörper, und Polypeptide .....	34
4.6	Puffer, Lösungen und Medien .....	35
4.6.1	Puffer und Lösungen für die Arbeit mit DNA .....	35
4.6.2	Puffer und Lösungen für die Arbeit mit Proteinen .....	36
4.6.3	Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien .....	37
4.6.4	Medien, Zusätze und Lösungen für die Arbeit mit Säugerzellen .....	37
4.7	Chemikalien und Kits .....	39

<b>4.8 Spezielle Geräte und Materialien .....</b>	<b>39</b>
<b>4.9 Software.....</b>	<b>40</b>
<b>5 METHODEN.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 DNA-Arbeitstechniken.....</b>	<b>41</b>
5.1.1 Isolation von DNA.....	41
5.1.2 Restriktionsverdau von DNA .....	41
5.1.3 Auffüllen 5'-überhängender Enden doppelsträngiger DNA.....	42
5.1.4 Dephosphorylierung linearisierter DNA.....	42
5.1.5 Gelelektrophorese von DNA.....	42
5.1.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Lösungen.....	42
5.1.7 Ligation .....	42
5.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
5.1.9 DNA-Sequenzierung .....	43
<b>5.2 Proteinanalytische Methoden.....</b>	<b>43</b>
5.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
5.2.2 Coomassie-Färbung .....	43
5.2.3 Immunoblot (Western).....	44
5.2.4 Trichlorazetat-Fällung von Proteinen .....	44
5.2.5 Bestimmung des Gesamtproteingehalts .....	44
<b>5.3 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>45</b>
5.3.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien .....	45
5.3.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> .....	45
5.3.3 Transformation elektrokompeter Bakterien .....	45
5.3.4 Arbeit mit Ff-Bakteriophagen.....	46
5.3.5 Plasmidmobilisierung und Tn7-Transposition .....	46
5.3.6 Listeriolysin O-Hämolysassay .....	47
5.3.7 Keimzahlbestimmungen .....	47
<b>5.4 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>47</b>
5.4.1 Kultivierung und Langzeitaufbewahrung von Säugerzelllinien.....	47
5.4.2 Isolation primärer Peritonealmakrophagen der Maus .....	48
5.4.3 Transfektion von Säugerzellen.....	48
5.4.4 Infektion von Säugerzellen mit Salmonellen .....	49
5.4.5 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	49
5.4.6 Nachweis von HBsAg in einer Probe .....	50
5.4.7 Transmissionselektronenmikroskopie .....	50
<b>5.5 Immunologische Methoden .....</b>	<b>50</b>
5.5.1 Intramuskuläre DNA-Vakzinierung.....	50

5.5.2	Orale Immunisierung mit Salmonellen .....	50
5.5.3	Analyse der Serumantikörperantwort .....	51
5.5.4	Analyse zytotoxischer T-Lymphozyten .....	51
5.5.5	Analyse der mukosalen Antikörperantwort .....	52
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>Plasmidtragende Salmonellen .....</b>	<b>53</b>
6.1.1	Wachstum und Plasmidstabilität in der Kultur .....	53
6.1.2	Infektion und Transfektion von Säugerzellen .....	54
<b>6.2</b>	<b>Sekretion von Plasmiden aus Salmonellen .....</b>	<b>56</b>
6.2.1	Sekretion filamentöser Phagenpartikel in der Kultur .....	56
6.2.2	Freisetzung von Phagenpartikeln in der Wirtszelle .....	58
<b>6.3</b>	<b>Freisetzung von Plasmid-DNA und Proteinen durch autolytische Salmonellen .....</b>	<b>59</b>
6.3.1	Phasenvariation zur Induktion bakterieller Autolyse .....	59
6.3.2	Protein-E-vermittelte Freisetzung von Plasmid-DNA und Listeriolysin O .....	61
6.3.3	Autolytisches Salmonellen-DNA-Vektorsystem basierend auf kompatiblen Plasmiden .....	65
<b>6.4</b>	<b>Optimierung des autolytischen Salmonellen-DNA-Vektorsystems .....</b>	<b>65</b>
6.4.1	Lambda-Lyseoperon als Alternative zu Protein E .....	65
6.4.2	Autolytisches Salmonellen-DNA-Vektorsystem basierend auf einem Plasmid .....	69
<b>6.5</b>	<b>Orale HBsAg-DNA-Vakzinierung mit autolytischen Salmonellen .....</b>	<b>72</b>
6.5.1	Vergleich optimierter Ein-Plasmid-Konstrukte .....	72
6.5.2	Vergleich verschiedener Impfstämme .....	75
<b>7</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>105</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	105
	Veröffentlichungen .....	108
	Danksagung .....	109
	Lebenslauf .....	110



*Meinen Eltern*

### **3 Einleitung**

#### **3.1 Vakzinierung**

Infektionskrankheiten stellen weltweit die Hauptbedrohung für die menschliche Gesundheit und das Leben dar (WHO 2002). Während in den Industrieländern die moderne Medizin und ein hoher Lebensstandard Infektionskrankheiten weitgehend zurückgedrängt haben, blieb die Situation in den Entwicklungsländern unverändert dramatisch. Fast die Hälfte aller Todesfälle wird dort durch Infektionskrankheiten verursacht, wobei Kinder besonders betroffen sind. Erst das verstärkte Auftreten neuer und die Rückkehr alter, gegen Medikamente resistent gewordener Krankheitserreger hat die von Infektionskrankheiten ausgehende Gefahr in das öffentliche Bewusstsein der wohlhabenden Länder zurückgerufen. Der Wegfall von Grenzen und die zunehmende Mobilität beschleunigen zusätzlich die weltweite Verbreitung dieser Erreger. Exemplarisch für die neuen Herausforderungen der Medizin des 21. Jahrhunderts steht der globale Kampf gegen die Immunschwächeerkrankung AIDS. Seit dem Auftreten erster klinischer AIDS-Erkrankungen und der Entdeckung des HIV-Virus vor 20 Jahren hat die AIDS-Epidemie in einigen Teilen der Welt ein verheerendes Ausmaß erreicht. Am schlimmsten betroffen ist das südliche Afrika, wo AIDS in einigen Gebieten die Lebenserwartung bereits halbiert hat. In anderen Teilen der Welt steht die Epidemie noch am Anfang, jedoch zeichnen sich auch dort alarmierende Zuwachsraten ab, z.B. in Asien und Osteuropa (WHO 2001). In Anbetracht dieser Bedrohung hat die Vollversammlung der Vereinten Nationen im Juni 2001 eine umfassende Erklärung zur Bekämpfung von AIDS verabschiedet (UNO 2001), worin der Entwicklung eines präventiven Impfstoffs eine hohe Priorität eingeräumt wird.

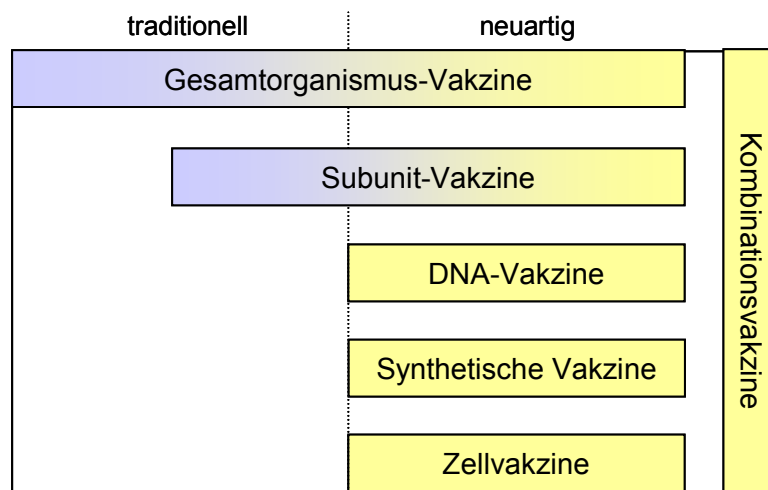
Schutzimpfungen gehören zu den effektivsten und preisgünstigsten vorbeugenden Maßnahmen in der Medizin und haben, neben Chemotherapeutika, einen wesentlichen Anteil an der erfolgreichen Bekämpfung von Krankheitserregern. Das Prinzip der Schutzimpfung besteht in der Nachahmung des gefährlichen Krankheitserregers durch den harmlosen Impfstoff, so dass bei späterem Kontakt mit dem Erreger das Immunsystem schnell und effektiv Abwehrmaßnahmen auslöst, die den Ausbruch der Krankheit verhindern. Dem Einsatz von Impfstoffen ist es zu verdanken, dass einige wichtige bakterielle und virale Infektionskrankheiten weltweit zurückgedrängt wurden, wie z.B. Diphtherie, Wundstarrkrampf, Keuchhusten, Kinderlähmung, Masern, Röteln und Mumps. Zu den größten Erfolgen internationaler Impfprogramme gehört die von der Weltgesundheitsorganisation am 8. Mai 1980 offiziell erklärte vollständige Ausrottung der Pocken (WHO 1980). Diesem Erfolg ging eine etwa 200-jährige Geschichte der Impfstoffentwicklung voraus. Das Konzept der aktiven Immunisierung wurde 1796 durch ein gewagtes Experiment des englischen Arztes Edward Jenner begründet. Er injizierte einem achtjährigen Jungen erst Kuhpockenviren (Vacciniaviren) und konnte ihn somit vor einer anschließenden Infektion mit Pocken (Variolaviren) schützen (Jenner 1798). Der Versuch gelang, weil die harmlose Kuhpockeninfektion im Menschen eine ausreichend breite, auch gegen Pockenviren schützende Immunantwort auslöst. Jenner

verwendete für sein Verfahren den Begriff „vaccination“, der später von Louis Pasteur in Anerkennung dieses bahnbrechenden Experiments für alle Impfverfahren übernommen wurde. Jenners Versuch gelang ohne Kenntnis der Wechselbeziehungen zwischen mikrobiellen Krankheitserregern (Pathogenen) und dem menschlichen Immunsystem. Etwa 80 Jahre später erkannte Robert Koch bei der Suche nach dem Milzbranderreger erstmals den ursächlichen Zusammenhang zwischen einem Pathogen und einer bestimmten Infektionskrankheit (Koch 1876). Diese Erkenntnis führte schnell zur Identifizierung und Kultivierung bakterieller Erreger mehrerer wichtiger Erkrankungen, z.B. von Tuberkulose, Cholera, Typhus, Pest und Diphtherie. In der Entwicklung abgeschwächter, bakterieller Lebendvakzine leistete Louis Pasteur Pionierarbeit. Im Jahre 1879 beobachtete er, dass Kulturen des Erregers der Geflügelcholera, *Pasteurella septica*, nach zweiwöchiger Lagerung ihre krankheitserregende Wirkung (Virulenz) in Hühnern verloren. Auch eine nachfolgende Gabe frischer Bakterien führte bei diesen Tieren nicht, wie in unbehandelten Hühnern, zur Erkrankung. Pasteur schlussfolgerte, dass die Lagerung der Kulturen zur Abschwächung (Attenuierung) der Virulenz der Bakterien führte, jedoch ihre schutzinduzierende Wirkung (Immunogenität) erhalten blieb (Pasteur 1880). Mit ähnlichen Strategien gelang es Pasteur und anderen Mikrobiologen, attenuierte Lebendvakzine gegen eine Reihe bakterieller Erkrankungen zu entwickeln. Neben Lebendimpfstoffen wurden auch abgetötete Bakterien erfolgreich als Vakzine verwendet, z.B. gegen Cholera und Typhus. Schwieriger gestaltete sich die gezielte Entwicklung von Vakzinen gegen virale Pathogene, vor allem aufgrund fehlender Möglichkeiten zur Erregeridentifizierung und deren Kultivierung. Dennoch gelang es Pasteur und seinen Kollegen bereits 1885, eine attenuierte virale Lebendvakzine gegen Tollwut herzustellen und erfolgreich anzuwenden (Pasteur 1885). Das Prinzip der passiven Immunisierung wurde 1890 durch Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato begründet. Auf der Suche nach einer Therapie für Diphtherie immunisierte Behring Meerschweinchen mit abgeschwächten Diphtherieerregern. Die Übertragung des Serums dieser Tiere führte zur Heilung bereits erkrankter Tiere und gesunde Tiere konnten so vor einer Infektion geschützt werden (Behring und Shibasaburo 1890). Einen ähnlichen Ansatz verfolgte er gemeinsam mit Kitasato zur Heilung von Wundstarrkrampf. Die neu begründete Serumtherapie rettete wenig später vor allem vielen Kindern das Leben.

Eine schützende Immunantwort entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Arms des Immunsystems. Die angeborene Immunantwort stellt die erste Verteidigungslinie dar. Zum Beispiel kann der Kontakt mit Bakterien im Körper zur Aktivierung des Komplementsystems oder von phagozytischen Zellen führen, insbesondere von Makrophagen, die dann die Bakterien direkt attackieren. Gleichzeitig werden durch diese Zellen Zytokine sekretiert, die weitere Leukozyten anlocken und aktivieren. Dieser als Entzündungsreaktion bezeichnete Prozess löst die Entwicklung der erworbenen Immunantwort aus, die zu einer gezielten Beseitigung des Krankheitserregers und einem langanhaltenden Schutz vor demselben führt. Die erworbene Immunität beruht auf der klonalen Selektion und Expansion von Lymphozyten, die jeweils einen einzigartigen Rezeptor zur Erkennung körperfremder Substanzen (Antigene) tragen. Trifft ein Antigen auf eine Zelle mit dem passenden Oberflächenrezeptor, so kommt es zur Aktivierung und klonalen Proliferation nur

dieser antigenspezifischen Zelle. Der neue Zellklon spielt dann eine zentrale Rolle bei der Koordinierung der Effektorfunktionen sowie für das immunologische Gedächtnis. Da sich Pathogene in ihrer Lebensweise unterscheiden, erfordert ihre Erkennung und Abwehr ganz unterschiedliche Mechanismen. Das Immunsystem verfügt über zwei Klassen von Lymphozyten mit verschiedenen Antigenrezeptoren. B-Zellen tragen membranassoziierte Antikörpermoleküle, die bei Bindung an frei im Blut oder in extrazellulären Flüssigkeiten vorkommende Antigene zu Plasmazellen reifen und große Mengen Antikörper gleicher Spezifität sekretieren. Die durch Antikörper vermittelten Effektorfunktionen werden als humorale Immunantwort bezeichnet. Antikörper können durch direkte Bindung Pathogene oder Toxine neutralisieren sowie durch Antigenmarkierung phagozytische Zellen oder das Komplementsystem zur Bekämpfung bestimmter Erreger spezifisch lenken. Die erfolgreichen traditionellen Impfstoffe basieren vor allem auf der Induktion einer schützenden Antikörperantwort (Kaufmann et al. 1999). Dagegen können Viren, intrazelluläre Parasiten sowie Tumorzellen der Erkennung durch B-Zellen entgehen und sind einer Antikörper-vermittelten Immunantwort häufig unzugänglich. Für die Erkennung und Bekämpfung infizierter oder entarteter Zellen sind die T-Zellen, die zweite Lymphozyten-Klasse mit einem spezifischen Oberflächenrezeptor, von zentraler Bedeutung. Im Gegensatz zu B-Zellen erkennt der T-Zellrezeptor keine größeren Strukturen freier Antigene, sondern kleine Peptidfragmente im Kontext von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC). Zwei Klassen dieser membrangebundenen Glykoproteine werden unterschieden. MHC-I-Moleküle kommen auf Zellen aller Gewebe vor und binden Peptidbruchstücke zytosolisch synthetisierter Proteine, z.B. Antigene intrazellulär replizierender Viren. Freie MHC-I-Moleküle werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Peptiden beladen und anschließend auf der Zelloberfläche naiven T-Zellen zur Erkennung präsentiert. Nur T-Zellen mit einer Präferenz für MHC-I-Peptidkomplexe ( $CD8^+$ -T-Zellen) und dem passenden peptidspezifischen Rezeptor werden bei Kontakt aktiviert und können unmittelbar die erkannte Zelle zerstören.  $CD8^+$ -Effektorzellen werden deshalb auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bezeichnet. Die Peptidbeladung von MHC-II-Molekülen, der zweiten MHC-Molekülklasse, erfolgt dagegen nur in dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen. Diese Zellen sind auf die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen und deren Präsentation als Peptide auf Komplexen beider MHC-Klassen spezialisiert und werden deshalb als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet. Im Gegensatz zu MHC-I gelangen in den MHC-II-Präsentationsweg nur Peptidfragmente von Antigenen aus intrazellulären Vesikeln. Diese können von phagozytiertem Material oder aber auch von intrazellulär lebenden Bakterien oder Parasiten stammen. MHC-II-Peptidkomplexe werden ebenfalls von T-Zellen mit peptidspezifischen Rezeptor erkannt. Diese Zellen verfügen jedoch nicht wie die CTL über direkte Abwehrfunktionen, sondern unterstützen andere Effektorzellen bei der Erregerbekämpfung. Sie werden als T-Helferzellen (Th) bezeichnet und können anhand des  $CD4$ -Oberflächenmarkers ( $CD4^+$ ) identifiziert werden. Th-Zellen spielen bei der Steuerung der erworbenen Immunantwort eine wichtige Rolle. Stimuliert durch die Art der Entzündungsreaktion lenken Th-Zellen die Immunabwehr entweder in Richtung einer eher zellulären Immunantwort (Th1-Antwort) oder entgegengesetzt in Richtung der humoralen Immunantwort (Th2-Antwort).

Die hohe Wirksamkeit attenuierter Lebendvakzine oder die Immunisierung mit inaktivierten Erregern (Gesamtorganismus-Vakzine) wurde von den Pionieren der Impfstoffentwicklung in vielen Fällen etabliert. Diese traditionellen Impfstoffe sind vor allem gegen akut verlaufende Krankheiten wirksam, versagen aber teilweise oder vollständig gegen Erkrankungen mit chronischem Verlauf, z.B. AIDS, Hepatitis B und C, Tuberkulose, Malaria und Krebs. Die Entwicklung einer neuartigen Vakzinegeneration gegen intrazelluläre Erreger und Krebs zielt vor allem auf die Stimulation von Th1-Zellen und CTL-Antworten ab (Kaufmann et al. 1999). Außerdem haben Sicherheitsaspekte und praktische Gründe die Verbesserung der traditionellen Vakzine und die Entwicklung neuer Impfstoffklassen vorangetrieben. Im Idealfall sollte ein Impfstoff für die breite Anwendung folgende Kriterien erfüllen, i) in allen Impfungen hochwirksam sein, ii) einen lebenslangen Schutz durch eine einmalige Gabe induzieren, iii) absolut sicher sein, iv) ungekühlt lagerstabil sein, v) einfach verabreichbar sein, z.B. oral oder nasal und vi) in ausreichender Menge zu geringen Kosten herstellbar sein (Babiuk 1999). In der Vakzineentwicklung müssen also gleichzeitig mehrere Aspekte berücksichtigt werden. Die Antigenkomponente eines Impfstoffs sollte möglichst mehrere schutzinduzierende Bereiche (Epitope) enthalten, die entweder von B-Zellen oder von T-Zellen erkannt werden. Besonders die Erkennung von T-Zellepitopen variiert zwischen verschiedenen Menschen aufgrund individuell unterschiedlicher Peptidbindungseigenschaften der MHC-Moleküle, so dass für die wirksame Vakzinierung aller Individuen oft ein Angebot mehrerer Epitope notwendig wird. Die Wirksamkeit einer Vakzine hängt darüber hinaus entscheidend von dem Ort und dem Milieu ab, in dem die Antigenkomponente dargeboten wird. Hierfür ist die Wahl des geeigneten Trägersystems oder eines Adjuvanz von großer Bedeutung. Gesamtorganismus-Vakzine nehmen unter den Impfstoffklassen nach wie vor eine zentrale Stellung ein (Abb. 1). Ein Meilenstein in der Entwicklung definierter sicherer Impfstoffe wurde 1980 mit der Zulassung der ersten rekombinanten Subunit-Vakzine gegen das Hepatitis-B-Virus (HBV) gesetzt, die durch Expression des kleinen HBV-Oberflächenantigens (HBsAg) in Hefe hergestellt wurde (Ellis 1991). Generell ist die Verwendung synthetischer Vakzinekomponenten attraktiv, da ihre Herstellung kontrolliert verläuft und die Anwendung sicher und dosierbar ist. Neben ganzen Proteinen können lediglich Peptide bekannter T-Zellepitope synthetisiert und als Vakzine direkt verabreicht werden (Wiesmuller et al. 2001). Solche Peptide oder Proteinantigene werden auch verwendet, um *in vitro* optimal eingestellte DC zu beladen und sie dann als sogenannte Zellvakzine dem Patienten zu injizieren (Meidenbauer et al. 2001). In zunehmendem Maße werden Impfstoffe verschiedener Klassen zu komplexen Vakzinesystemen kombiniert (Kombinationsimpfstoffe), oder im Verlauf einer Immunisierung nacheinander verabreicht, eine als heterologes Prime-Boost bezeichnete Strategie. Ein immer besseres Verständnis von Pathogenitätsmechanismen und die umfassende Kenntnis von Genom- und Proteomdaten der Erreger beschleunigt wesentlich die Identifizierung schützender Antigene. Moderne gentechnische und chemische Methoden ermöglichen die optimale Formulierung und die gezielte Verabreichung neuer Impfstoffe.



**Abb. 1: Übersicht wichtiger Impfstoffklassen.** Während die traditionellen Impfstoffe bereits vor über hundert Jahren entwickelt wurden, erfolgte die Etablierung neuartiger Konzepte vor allem in den letzten zehn Jahren.

### 3.2 Genetische Vakzinierung

Die Verwendung der genetischen Information eines Antigens anstelle des Proteins als Vakzine ist eine neue Impfmethode und hat innerhalb kurzer Zeit viele Bereiche der Impfstoffentwicklung erfasst (Whalen 1996). Die genetische Vakzinierung, oder DNA-Vakzinierung, wurde durch erste Versuche etabliert, die zeigten, dass die direkte Injektion von eukaryontischen Expressionsplasmiden in das Muskelgewebe der Maus zur Expression des Transgens führt (Wolff et al. 1990), wodurch eine antigenspezifische Immunantwort entsteht (Tang et al. 1992). Analog zu einer viralen Infektion ermöglicht die Expression des Transgens in den Körperzellen die korrekte Faltung und Glykosylierung sowie den direkten Zugang des Antigens in den MHC-I-Präsentationsweg, so dass potente CTL-Antworten induziert werden. Das Antigen wird in der Folge auch als Protein von transfizierten Zellen freigesetzt, z.B. durch CTL-vermittelte Zelllyse, so dass Antikörperantworten und Th-Zellantworten stimuliert werden können (Davis et al. 1997). Verglichen mit viralen Lebendvakzinen ist Plasmid-DNA aufgrund ihrer höheren Stabilität, der Reinheit und Definiertheit sowie der billigen Herstellung vorteilhaft. Desweiteren sind CpG-Motive der DNA-Sequenz ein natürliches Adjuvanz. Sie sind in Bakterien, anders als in eukaryontischen Zellen, unmethyliert und werden daher vor allem von Makrophagen und NKT-Zellen mittels des TLR-9-Rezeptors erkannt (Hemmi et al. 2000). In Folge der Aktivierung dieser Zellen werden proinflammatorische Zytokine sekretiert, die eine Th1-geneigte zelluläre Immunantwort und folglich potente CTL-Antworten begünstigen (Roman et al. 1997; Krieg und Davis 2001).

Gegenwärtig wird eine Vielzahl von Ansätzen verfolgt, um die Effizienz von DNA-Vakzinen zu erhöhen und diese Methode an ganz bestimmte Impferfordernisse anzupassen (Leitner et al. 1999). Mit Hilfe der Gentechnik können auf der DNA-Ebene leicht Antigeneigenschaften optimiert oder immunmodulatorische Komponenten in die DNA-Vakzine integriert werden. Die Auswahl einer geeigneten eukaryontischen Expressionskassette ist wichtig für die

Antigendosierung (Norman et al. 1997). Während virale Antigene in eukaryontischen Zellen meist gut exprimierbar sind, werden manche bakterielle oder protozoische Antigene aufgrund fundamentaler Unterschiede zu eukaryotischen Genen, z.B. die Kodonverwendung oder die mRNA-Stabilität, nur schlecht oder gar nicht exprimiert (Strugnell et al. 1997). Durch die Optimierung der DNA-Sequenz kann die Expressionshöhe und damit die Eignung solcher Antigene für eine DNA-Vakzine wesentlich verbessert werden (Uchijima et al. 1998; Narum et al. 2001). Die Immunogenität von Antigenen kann gezielt durch Veränderungen der Proteineigenschaften erhöht werden. Der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb schwacher T-Zellepitope ist ein Weg, um die Affinität für das MHC-Molekül zu steigern und somit stärkere T-Zellantworten zu induzieren (Irvine et al. 1999). Die Fusion des Antigens mit einem Sekretionssignal kann die humorale Immunantwort erhöhen (Svanholm et al. 1999) oder die Fusion mit Ubiquitin zu einer verstärkten Antigenprozessierung und zu einer verbesserten Präsentation beitragen (Liu et al. 2001). Vielversprechend für die Induktion einer multivalenten Immunantwort ist die Konstruktion sogenannter Polyepitop-Vakzine, künstlicher Gene, die aus Epitopen verschiedener Antigene bestehen (Thomson et al. 1998; Hanke et al. 1998). Die Kopplung verschiedener Impfvektoren sowie ein bestimmter zeitlicher Ablauf der Wiederholungsimpfungen gestattet die Optimierung und Verstärkung von Immunantworten. Mit Hilfe dieser sogenannten Prime-Boost-Strategie ist es möglich, die Wirksamkeit einer DNA-Vakzine drastisch zu erhöhen (Ramshaw und Ramsay 2000). Die Kombination von DNA mit einem viralen Vektor ist besonders geeignet, um protektive zelluläre Immunantworten zu induzieren, z.B. gegen HIV und Malaria (Sedegah et al. 1998; Amara et al. 2001).

Von zentraler Bedeutung für die T-Zellaktivierung ist die Expression oder Aufnahme sowie die anschließende Prozessierung und Präsentation des plasmidkodierten Antigens durch professionelle APC, insbesondere DC. Sie durchlaufen nach der Antigenaufnahme einen Reifungsprozess, wandern in die T-Zellbereiche peripherer lymphatischer Organe ein und treten dort durch die Expression von MHC-Peptidkomplexen und kostimulatorischen Molekülen in Wechselwirkung mit den T-Zellen. Eine Möglichkeit, die DC der Haut direkt zu transfizieren, beruht auf dem Beschuss mit DNA-ummantelten Mikropartikeln, der sogenannten „gene gun“-Methode (Porgador et al. 1998). Protektive systemische humorale Antworten und CTL-Antworten wurden auf diesem Weg induziert (Condon et al. 1996; Tuting 1999). Diese Methode führt jedoch eher zur Stimulation einer Th2-Antwort, wahrscheinlich weil nur wenig DNA appliziert wird und so der Adjuvanzeffekt bakterieller DNA nicht zum Tragen kommt (Feltquate et al. 1997). Das Mikroklima während der APC-Aktivierung und der T-Zellinteraktion lenkt die Ausprägung der erworbenen Immunität. Zytokine, z.B. IL-12 und GM-CSF, oder kostimulatorische Moleküle, z.B. B7-1 und B7-2, können als Transgene in eine DNA-Vakzine integriert werden und so die Immunantwort gezielt steuern und verstärken (Kim et al. 1997; Iwasaki et al. 1997). Dabei ist die Verwendung bicistronischer Konstrukte sehr effektiv (Barouch et al. 2002). Besonders für das Brechen der „Selbst-Toleranz“ bei Tumorantigenen oder schwachen viralen Antigenen ist dieser Ansatz vielversprechend. Für die Aufnahme und Präsentation von antigenem Material aus apoptotischen Zellen sind DC prädestiniert (Albert et al. 1998). DNA-Vakzine, die neben dem Antigen ein Apoptose-induzierendes Transgen tragen,

z.B. Fas oder Caspasen, verstärken DC-vermittelte T-Zellantworten (Chattergoon et al. 2000; Sasaki et al. 2001). Die Kopplung hoher Antigenexpression und Apoptoseinduktion ist eine vielversprechende Strategie, DC zur effektiven Aufnahme und Präsentation von Antigenen zu stimulieren (Berglund et al. 1998; Ying et al. 1999).

Insbesondere das Mukosa-assoziierte lymphoide Gewebe (MALT) der Atmungsorgane und des Darmtraktes ist mit spezialisierten Bereichen zur Antigenaufnahme und Induktion antigenspezifischer Effektor- und Gedächtniszellen versehen. Spezialisierte Epithelzellen, die M-Zellen, ermöglichen die Passage partikulärer Antigene oder Mikroorganismen durch das Schleimhautepithel in das darunterliegende Lymphgewebe, wo besonders konzentriert DC und Makrophagen zur Antigenaufnahme bereitstehen (Neutra et al. 2001). Die Induktion einer mukosalen Immunantwort erfordert meist die gezielte Stimulierung der Lymphozyten des MALT. Das dortige Mikroklima führt zur Expression von „mucosal homing“-Rezeptoren auf aktivierten Lymphozyten, die diesen Zellen die Rückkehr aus der Zirkulation in die Schleimhaut ermöglichen (Kantele et al. 1997; Brandtzaeg et al. 1999). Die Verwendung mukosaler Impfstoffe ist sehr attraktiv, weil sie auch im systemischen Kompartiment potente Immunantworten induzieren und sich schmerzfrei entweder nasal, oral oder rektal verabreichen lassen (McGhee et al. 1992). Im Fall von HIV erfolgen mehr als 90% aller Infektionen über die Mukosa des Magen-Darm-Traktes und der Genitalien, die gleichzeitig das Hauptreservoir der Virusreplikation bildet (Veazey et al. 2001). Für die Prävention der Infektion sowie die Eindämmung der Virusvermehrung ist wahrscheinlich die Induktion einer zellulären, aber auch humoralen Immunantwort in diesem Kompartiment entscheidend (Belyakov et al. 2001; McMichael und Hanke 2002). Die Immunisierung mit löslichen Antigenen über die Schleimhäute erfordert die Kombination mit starken Adjuvantien, ansonsten besteht die Gefahr der Toleranzinduktion (Pizza et al. 2001). Die gegenwärtig prominenteste mukosale Vakzine ist die Sabin-Schluckimpfung gegen Kinderlähmung (Sabin und Boulger 1973), deren Anwendung nahezu zur kompletten globalen Ausrottung des Poliovirus geführt hat (Nomoto und Arita 2002). Die jüngere Erkenntnis, dass diese attenuierte Lebendvakzine in wenigen Fällen Virulenz wiedererlangen und Poliomyelitis verursachen kann, hat diesen Erfolg etwas getrübt und in den Industrieländern zum Ersatz der oralen Vakzine durch den inaktivierten intramuskulär applizierten Salk-Impfstoff geführt (Strebel et al. 1992). Da RNA-Viren allgemein sehr mutationsanfällig sind, verhindern vor allem Sicherheitsbedenken die Entwicklung neuer viraler Lebendvakzine, z.B. gegen HIV. Eine vielversprechende Alternative ist die Entwicklung mukosaler DNA-Vakzine auf der Basis von Plasmid-DNA oder anderer Gentransfersysteme. Verschiedene Strategien werden verfolgt, um den Transfer von Plasmid-DNA über die Schleimhäute zu optimieren. Die Verpackung der DNA in Mikrosphären gewährleistet den Schutz vor Nukleasen und begünstigt die M-Zell-vermittelte Passage der Schleimhaut. Bei oraler Gabe konnte mit diesem System erfolgreich Protektion in einem Rotavirus-Modell in der Maus induziert werden (Chen et al. 1998). Der gezielte Transport Polylysin-komplexierter DNA zu den M-Zellen, vermittelt durch das reovirale Adhesin  $\sigma 1$ , führte bei intranasaler Administration zu verbesserten mukosalen Antikörper- und CTL-Antworten (Wu et al. 2001). Verschiedene virale Vektoren kommen für die mukosale genetische Vakzinierung in Betracht

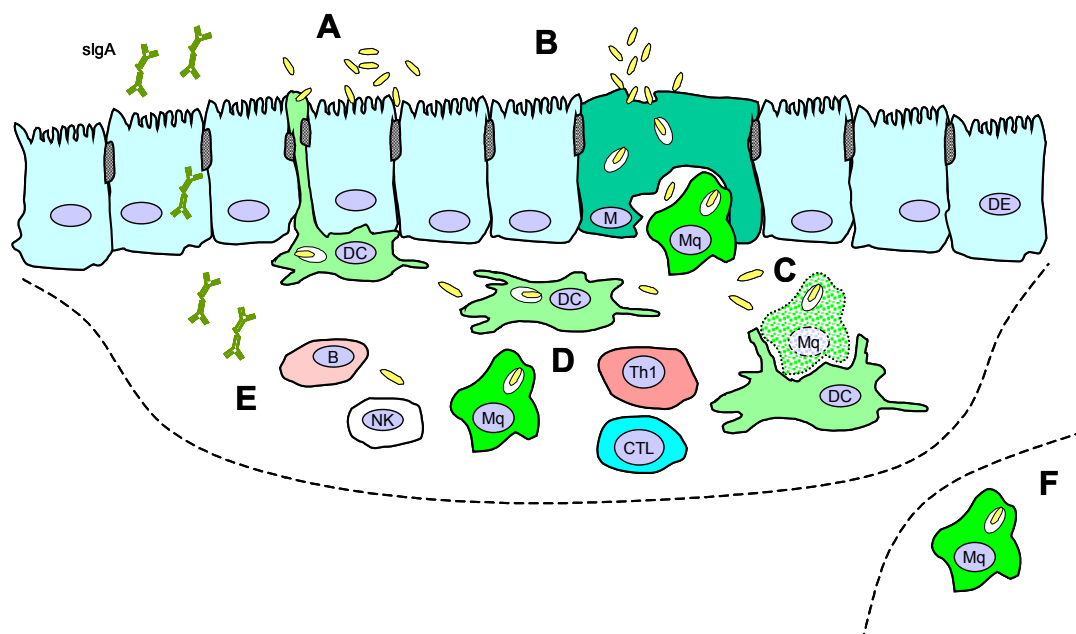


(Morrow et al. 1999). Beispielsweise führt die intranasale Gabe eines adenoviralen Vektors mit dem Glykoprotein B des HSV-Virus als Transgen zu einer schützenden Immunantwort vor einer HSV-Infektion (Gallichan und Rosenthal 1995). Die humorale und zelluläre Immunantwort an den Schleimhäuten kann erheblich durch die Anwendung einer Prime-Boost-Strategie verbessert werden (Eo et al. 2001). Anders als im systemischen Kompartiment war jedoch bei der mukosalen Verabreichung ein Prime mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus, gefolgt von einem DNA-Boost, wesentlich wirksamer als in umgekehrter Reihenfolge. Ein aussichtsreicher neuer Ansatz der mukosalen genetischen Vakzinierung ist die Verwendung rekombinanter attenuierter Bakterien als DNA-Trägersysteme, entweder allein oder in einem Prime-Boost-Regime (Weiss und Krusch 2001; DeVico et al. 2002).

### 3.3 Rekombinante attenuierte Salmonellen als Träger heterologer Antigene

Verschiedene attenuierte enteropathogene Bakterien sind als mukosale Impfstoffträger geeignet, da sie entsprechend ihrem natürlichen Infektionsweg gezielt das immuninduktive Gewebe der Darmschleimhaut, aber auch peripherer lymphatischer Organe infizieren und stimulieren (Sirard et al. 1999). Die Qualität der Immunantwort gegen das transportierte heterologe Antigen hängt von der Art der Attenuierung und dem genetischen Hintergrund des Impfstammes sowie von der Menge, der Darstellungsform und der zeitlichen Präsenz des Antigens ab. Die Gattung *Salmonella enterica* vereint eine diverse Gruppe gramnegativer Bakterien, die beim Menschen und bei Tieren darmentzündliche Erkrankungen unterschiedlichen Grades bis hin zu lebensbedrohlichem Typhus verursachen können. Weltweit werden jährlich etwa 16 Millionen Typhuserkrankungen registriert, von denen ca. 600000 tödlich verlaufen (Pang et al. 1998). Der Grad der Erkrankung wird durch den Serotyp der Salmonellen und die Art des infizierten Wirts bestimmt. Während der Serotyp Typhi im Menschen Typhus auslöst, wird in Mäusen eine sehr ähnliche Erkrankung durch *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (*S. enterica* Typhimurium) verursacht. Das Mausmodell ist für die Erforschung des Verlaufs einer Salmonellen-Infektion und der durch sie induzierten Immunantwort von großem Nutzen. Bei oraler Gabe passieren die Salmonellen den Magen, induzieren anschließend im Dünndarm den Eintritt in das Darmepithel, vorwiegend durch die M-Zellen der Peyer-Plaques (Jones et al. 1994), und infizieren darunterliegende DC sowie Makrophagen (Abb. 2) (Richter-Dahlfors et al. 1997; Hopkins et al. 2000). Während dieser frühen Infektionsphase werden mit Hilfe eines auf der Salmonellen-Pathogenitätsinsel-1 (SPI-1) kodierten Typ-III-Sekretionssystems mehrere Proteine direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle injiziert. Einige dieser Proteine induzieren die kurzzeitige Ausbildung von Membranausstülpungen, die für die Aufnahme der Bakterien in Epithelzellen erforderlich sind (Zhou und Galan 2001). Die Wirkung des injizierten Proteins SipB führt in Makrophagen zur Aktivierung der Caspase-1, so dass es einerseits zur Sekretion inflammatorischer Zytokine kommt, z.B. IL-1 $\beta$  und IL-18, andererseits der programmierte Zelltod ausgelöst wird (Hersh et al. 1999; Brennan und Cookson 2000). Beides ist für eine effiziente bakterielle Kolonisierung der Peyer-Plaques notwendig (Monack et al. 2000), wahrscheinlich weil weitere potentielle Wirtszellen angelockt werden. Während dieses Prozesses werden sterbende Makrophagen von DC phagozytiert, so dass bakterielle Antigene in den MHC-I- und MHC-II-Präsentationsweg gelangen und eine Salmonellen-spezifische T-

Zellaktivierung initiiert wird (Yrlid und Wick 2000). Intraepitheliale DC nehmen Salmonellen auch direkt aus dem Darmlumen auf, werden aktiviert und können die bakteriellen Antigene schnell T-Zellen präsentieren (Rescigno et al. 2001). Im weiteren Verlauf breitet sich die Infektion auf die systemischen lymphatischen Organe und die Leber aus, wo Salmonellen vorwiegend in Gewebsmakrophagen zu finden sind (Richter-Dahlfors et al. 1997).



**Abb. 2: Natürlicher Verlauf einer Salmonellen-Infektion nach oraler Aufnahme.** A) Direkte Aufnahme von Salmonellen durch intraepitheliale DC des Dünndarmepithels (DE). B) Passage der Bakterien durch die M-Zellen der Peyer-Plaques. C) Invasion von DC und Makrophagen (Mq) des MALT, durch Salmonellen abgetötete Makrophagen werden von DC phagozytiert. D) Antigenpräsentation und Stimulation von Immunzellen durch infizierte DC und Makrophagen. E) Freisetzung von Salmonellen-spezifischen sekretorischem IgA (slgA) durch B-Zellen. F) Einwanderung Salmonellen-infizierter Makrophagen in systemische lymphatische Organe und die Leber.

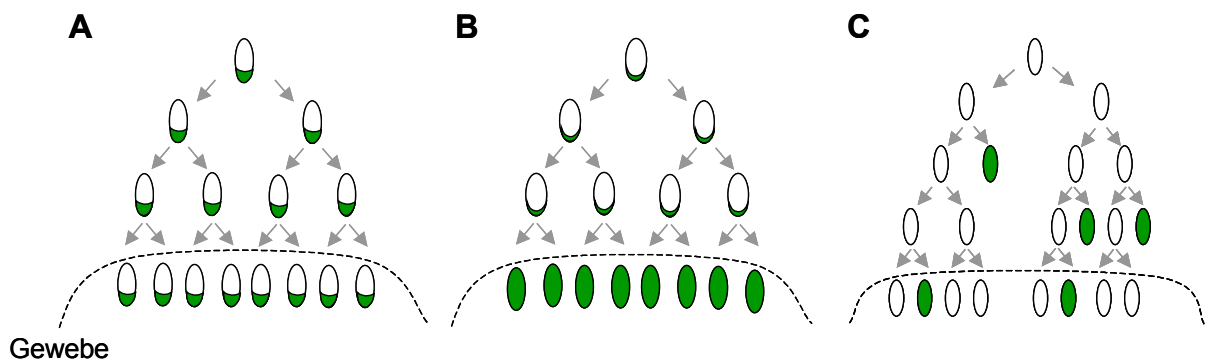
Innerhalb der Wirtszelle befinden sich die Salmonellen in einer membranumhüllten Vakuole, die durch bakterielle Mechanismen während der systemischen Infektionsphase in eine geschützte Nische für die bakterielle Replikation verwandelt wird. Diese Mechanismen werden vor allem durch Effektormoleküle der Salmonellen-Pathogenitätsinsel-2 (SPI-2) vermittelt (Hensel 2000), die ebenfalls durch ein SPI-2-eigenes Typ-III-Sekretionssystem direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle injiziert werden. Beispielsweise wird so der Import der NADPH-Oxidase in das Phagosom verhindert und damit ein wichtiges Enzym der unmittelbaren antibakteriellen Abwehr in Makrophagen ausgeschaltet (Vazquez-Torres et al. 2000).

Auf der Seite des Wirtes wird die erste Gegenwehr durch das angeborene Immunsystem geleistet, insbesondere durch Makrophagen und neutrophile Zellen (Vassiloyanakopoulos et al. 1998). TLR-Rezeptoren auf Zellen des infizierten Gewebes fungieren als Gefahrensensoren, indem sie bakterielle Komponenten, wie z.B. LPS, Lipoprotein, Flagellin und bakterielle DNA, erkennen (Aderem und Ulevitch 2000) und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, vor

allem  $\text{IFN}\gamma$ , IL-12,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-18, auslösen (Mittrucker und Kaufmann 2000).  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  sind ausschlaggebend für die Aktivierung antibakterieller Effektormechanismen der Makrophagen (Nauciel und Espinasse-Maes 1992; Gulig et al. 1997). In der frühen Phase der Infektion sind NK-Zellen eine wichtige Quelle von  $\text{IFN}\gamma$  (Ramarathinam et al. 1993), aber auch Makrophagen, B- und NKT-Zellen tragen zu dessen Produktion bei (Yoshimoto et al. 1997; Munder et al. 1998; Emoto et al. 1999). In resistenten Mäusen wird ein Großteil der Bakterien durch Makrophagen abgetötet, vermittelt vor allem durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (Vazquez-Torres und Fang 2001). Fehlt den Mäusen jedoch *Nramp1*, ein in Makrophagen exprimiertes Transmembranprotein, so sind die Tiere empfindlicher gegenüber der Salmonellen-Infektion und die erworbene Immunität gewinnt an Bedeutung (Vidal et al. 1995). Durch das Zytokinmilieu der Entzündung wird eine Th1-geneigte  $\text{CD4}^+$ -T-Zellantwort stimuliert, die für die vollständige Beseitigung aller Bakterien und den Schutz vor einer erneuten Infektion notwendig ist (Mittrucker und Kaufmann 2000). Die Aktivierung von Salmonellen-spezifischen  $\text{CD4}^+$ -Th1-Zellen erfolgt schon wenige Stunden nach Infektionsbeginn in den Peyer-Plaques und mesenterischen Lymphknoten, wofür wahrscheinlich die direkte lokale Antigenpräsentation durch DC ausschlaggebend ist (McSorley et al. 2002). An der schützenden Immunantwort gegen Salmonellen sind auch  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen beteiligt (Lo et al. 1999) und es wurden spezifische CTL für aus Salmonellen freigesetzte heterologe Antigene nachgewiesen (Aggarwal et al. 1990; Turner et al. 1993; Lillard, Jr. et al. 2001). Im Gegensatz zu der  $\text{CD4}^+$ -T-Zellantwort spielt die Antikörperantwort bei der Begrenzung der bakteriellen Infektion keine Rolle, ist jedoch für den Schutz vor einer erneuten Infektion in *nramp1*<sup>-/-</sup> Tieren erforderlich (Mastroeni et al. 1993; Mittrucker et al. 2000). Während der aufeinander folgenden Infektionsphasen erfüllen Antikörper verschiedene Funktionen. Die mukosale Sekretion von Salmonellen-spezifischen Antikörpern vermindert die Invasion über das Darmepithel (Michetti et al. 1992). Andererseits vermitteln systemische Antikörper die Beseitigung der Bakterien aus dem Blut oder die gesteigerte Aufnahme durch phagozytische Zellen. Für die spezifische Aktivierung und Reifung von B-Zellen ist die Unterstützung durch T-Zellen über direkten Zellkontakt oder die Sekretion von Zytokinen notwendig (Mastroeni et al. 2001).

Die Eignung lebender attenuierter Salmonellen für die breite humane Immunisierung wurde durch die erfolgreiche Anwendung des Typhusimpfstoffs *Salmonella enterica* Serovar Typhi Ty21a nachgewiesen (Engels et al. 1998). Dieser Impfstamm wurde durch zufällige chemische Mutagenese erzeugt (Germanier und Fuer 1975), wobei der genaue Umfang der Abschwächung bisher nicht exakt bestimmt werden konnte. Die Induktion schützender Immunität erfordert drei bis vier orale Impfdosen und dauert mehrere Jahre an. Auf dieser Grundlage erfolgt die Entwicklung neuer Impfstämme mit gesteigerter Immunogenität bei einmaliger oraler Gabe, guter Verträglichkeit, hoher Sicherheit und Stabilität (Bumann et al. 2000). Vor allem im Tiermodell, aber auch in klinischen Studien wurden bereits neue Impfstämme erfolgreich getestet und die Induktion mukosaler, humoraler sowie zellvermittelter Immunantworten gegen verschiedene Antigene demonstriert sowie Immunität gegen Bakterien-, Virus- oder Protozoen-Infektionen und Tumoren induziert (Shata et al. 2000; Bumann et al. 2000). Die Verwendung attenuierter Salmonellen als Träger heterologer Antigene erfordert die

Auswahl eines geeigneten Stammes und eines optimalen Antigenexpressionssystems. Umfangreiche Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Salmonellen und dem Wirtsorganismus machen die Programmierung von Trägerstämmen für ganz bestimmte Impfsituationen mittels gentechnischer Methoden möglich. Gezielte Attenuierungen der Bakterien in Virulenzgenen, regulatorischen Genen oder Stoffwechselgenen werden vorgenommen und ergeben ein Repertoire unterschiedlich immunogener Impfstämme (Raupach und Kaufmann 2001). Zusätzliche Faktoren, z.B. die Zytokine IL-2 oder TNF $\alpha$ , können durch den Impfstamm freigesetzt werden und die Immunantwort des Wirtes feinregulieren (al Ramadi et al. 2001). Die Verfügbarkeit des heterologen Antigens in ausreichender Menge über eine bestimmte Zeitspanne ist für die Induktion einer potenten antigenspezifischen Immunantwort entscheidend. Die Antigensynthese wird in den meisten Fällen durch plasmidkodierte Expressionssysteme gesteuert. Eine kontinuierliche Synthese sowie die Erhaltung des Plasmidvektors in hoher Kopienzahl stellen jedoch eine hohe Stoffwechselbelastung für den Trägerstamm dar, so dass dessen Immunogenität eingeschränkt und die Plasmidsegregation instabil wird (Abb. 3, A) (Galen und Levine 2001). Die Integration der Expressionskassette in das bakterielle Chromosom ist eine Möglichkeit, die Antigensynthese zu stabilisieren, jedoch auf niedrigem Niveau, da nur eine Genkopie vorliegt (Gonzalez et al. 1994; Hohmann et al. 1995). Zur Stabilisierung von Expressionplasmiden wurden komplementierende Gene für lethale chromosomale Mutationen in die Plasmide integriert, z.B. *asd* (Aspartat  $\beta$ -Semialdehyd Dehydrogenase) (Galan et al. 1990) oder *thyA* (Thymidylat Synthetase) (Morona et al. 1991). Im Gegensatz zur konstitutiven Antigenexpression ermöglicht der Einsatz *in vivo* induzierbarer Promotoren die gezielte Antigensynthese im immuninduktiven Gewebe (Abb. 3, B). Dadurch wird die bakterielle Stoffwechsellast während der Invasionsphase minimiert, so dass die Immunogenität der Impfbakterien erhalten bleibt und die Plasmidstabilität erhöht wird (Chatfield et al. 1992). Die Expression toxischer Antigene ist jedoch mit den derzeit verfügbaren *in vivo*-Promotoren nicht möglich, da eine basale Hintergrundexpression von diesen Elementen auch im nicht-induzierten Zustand ausgeht (Bumann 2001; Orr et al. 2001). Dagegen ist ein neuartiges Zwei-Phasen-Expressionssystem (ZPES), basierend auf dem Prinzip der genetischen Variation, für die Synthese toxischer Antigene geeignet (Yan und Meyer 1996). Die Antigenexpression mit diesem System wird erst durch die Inversion eines definierten Fragmentes des bakteriellen Chromosoms, katalysiert durch die Invertase Gin des Bakteriophagen Mu, in einem Teil der Bakterien einer Kultur angeschaltet (Abb. 3, C).



**Abb. 3: Prinzipien der Antigenexpression durch bakterielle Lebendvakzine.** A) Bakterien exprimieren das heterologe Antigen konstitutiv auf moderatem Niveau. B) Die Expression des Antigens wird bei Eintritt in das Gewebe stark induziert, jedoch wird auch vor dem Eintritt in das Gewebe in Abhängigkeit des gewählten *in vivo*-induzierten Promotors das Antigen meist auf einem basalen Niveau exprimiert. C) Fortwährende Induktion der Antigenexpression in einigen Zellen der bakteriellen Gesamtpopulation, ausgelöst durch das ZPES des Impfstammes.

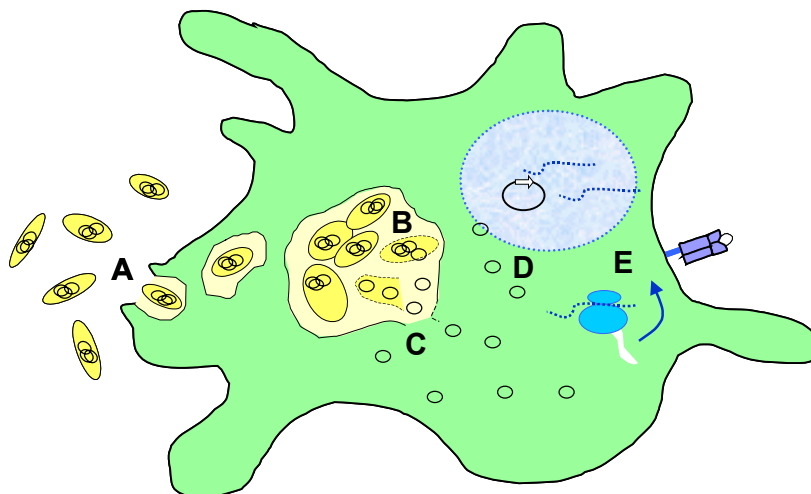
Neben der zeitlich- und geweberegulierten Antigenexpression, ist die Kompartimentierung und die daraus resultierende Präsentation des heterologen Antigens für die Induktion einer bestimmten Immunantwort kritisch. Verschiedene Systeme sind verfügbar, um heterologe Antigene oder andere Faktoren im bakteriellen Zytoplasma, im Periplasma, assoziiert mit der bakteriellen Oberfläche oder aber in sekretierter Form darzustellen. Das *E.coli*  $\alpha$ -Hämolysinsekretionssystem (*E.coli-hlyA*-System), den Typ-I-Sekretionssystemen gramnegativer Bakterien zugehörig, ist für den Export heterologer Antigene durch rekombinante attenuierte Salmonellen geeignet, da Passagierproteine kaum Einschränkungen hinsichtlich ihrer Größe oder Struktur unterliegen (Su et al. 1992; Gentschev et al. 2002). Im Gegensatz zu der zytoplasmatischen Antigenexpression stimuliert beispielsweise die Sekretion von P60 und Listeriolysin O (LLO), zwei Virulenzfaktoren des grampositiven Keimes *Listeria monocytogenes*, eine schützende zelluläre Immunantwort (Hess et al. 1996). Die natürliche Funktion von LLO, spezifisch die phagosomale Membran zu zerstören und Listerien in das Zytoplasma zu entlassen (Gaillard et al. 1987), kann mit Hilfe des *E.coli-hlyA*-Systems auf Salmonellen übertragen werden (Gentschev et al. 1995). Dadurch wird der Zugang zum MHC-I-Präsentationsweg für heterologe Antigene aus Salmonellen erleichtert (Catic et al. 1999). Unter Ausnutzung des SPI-2 kodierten Typ-III-Sekretionsapparates können immunogene Epitope aus Salmonellen auch direkt durch die phagosomale Membran in das Zytoplasma der Wirtszelle transferiert und in den MHC-I-Präsentationsweg eingeführt werden, wodurch schützende CTL-Antworten induziert werden (Rusmann et al. 1998). Die Antigendarstellung auf der bakteriellen Zelloberfläche wurde beispielsweise als Fusion mit dem prominenten bakteriellen Oberflächenprotein Flagellin (Cattozzo et al. 1997) oder mit dem AIDA-Autotransporter von *E.coli* (Maurer et al. 1997) erreicht. Die induzierte aktive Lyse des Carriers ist eine weitere Möglichkeit, Makromoleküle aus dem bakteriellen Zytoplasma freizusetzen (Jain und Mekalanos 2000).

### 3.4 Salmonellen als Vektoren für die genetische Vakzinierung

Ein vielversprechender Ansatz der genetischen Vakzinierung ist die Verwendung attenuierter, intrazellulärer Bakterien als Vektoren für eukaryontische Expressionsplasmide (Shata et al. 2000; Weiss und Krusch 2001; Dietrich et al. 2003). Die mukosale Verabreichung dieser Bakterien, z.B. Salmonellen, Shigellen, invasive *E.coli*, Listerien oder Yersinien, ermöglicht den zielgenauen DNA-Transfer und somit die direkte Antigenexpression in DC und Makrophagen des MALT. Die begrenzte bakterielle Infektion übt dabei eine Adjuvanzfunktion aus, in deren Ergebnis eine robuste Th1-gerichtete zelluläre Immunantwort stimuliert wird. Das Konzept der bakteriellen DNA-Vakzinierung dehnt das Anwendungsspektrum von Impfstämmen auf Antigene aus, die erst durch posttranslationale Modifikationen in der eukaryontischen Zelle ihre immunogene Struktur erhalten, z.B. das HIV-Hüllprotein gp120 (DeVico et al. 2002), oder für Bakterien selbst toxisch sind. Die Eigenschaften des Impfstammes werden außerdem nicht von der Expressionshöhe des Antigens beeinträchtigt, wodurch die stabile Erhaltung des plasmidkodierten Expressionssystems erleichtert wird.

Der Transfer eines eukaryontischen Expressionsplasids aus fakultativ intrazellulären Bakterien in Säugerzellen wurde erstmalig mit einem *asd*-attenuierten *Shigella flexneri*-Stamm *in vitro* und *in vivo* demonstriert (Sizemore et al. 1995; Sizemore et al. 1997). Diese gramnegativen Bakterien zerstören nach Invasion der Wirtszelle das Phagosom, lysieren aufgrund der Attenuierung im Zytoplasma und setzen dort Plasmid-DNA frei. Das grampositive Bakterium *Listeria monocytogenes* ist als DNA-Vektor ebenfalls geeignet (Dietrich et al. 1998). Listerien zerstören durch die Sekretion von LLO das Phagosom und replizieren im Zytoplasma der Zelle (Cossart und Lecuit 1998). Überraschend war die Entdeckung, dass auch Salmonellen eukaryontische Expressionsplasmide in infizierte Wirtszellen transferieren können, da sie anders als Shigellen oder Listerien nach der Zellinvasion in dem Phagosom verbleiben und keinen Zugang zum Zytoplasma haben (Garcia-del Portillo und Finlay 1995). In den meisten bisherigen Studien zur Salmonellen-vermittelten DNA-Vakzinierung wurde der *aroA*-attenuierte *S.enterica* Typhimurium-Stamm SL7207 verwendet (Hoiseth und Stocker 1981). Die Deletion des *aroA*-Gens unterbricht den Chorismat-Biosyntheseweg und macht die Bakterien auxotroph für aromatische Verbindungen. In Mäusen führte die orale Gabe dieses Stammes, transformiert mit eukaryontischen Antigenexpressionplasmen, zur Infektion und anschließenden Transfektion von APC der Darmschleimhaut, insbesondere DC (Paglia et al. 1998), so dass schützende humorale und zelluläre Immunantworten gegen die plasmidkodierten Antigene stimuliert wurden (Darji et al. 1997; Weiss und Krusch 2001). Die zeitliche und örtliche Antigenpräsentation sowie die resultierende T-Zellaktivierung wurde nach oraler Gabe einer Salmonellen-DNA-Vakzine mit dem *E.coli-lacZ*-Gen als Modellantigen genauer analysiert (Darji et al. 2000; Weiss und Krusch 2001). Bereits acht Stunden nach Gabe der Vakzine konnte die zelluläre Immunaktivierung in den Peyer-Plaques, in mesenterischen Lymphknoten und in der Milz detektiert werden. Auch noch nach 35 Tagen wurde in den mesenterischen Lymphknoten und der Milz Antigenpräsentation nachgewiesen, jedoch nicht mehr in den Peyer-Plaques. Weiterhin wurden die MHC-Klasse und der Typ der in die spezifische Präsentation involvierten APC ermittelt. Während Makrophagen nur MHC-II-vermittelt und nur in Peyer-Plaques Antigen

präsentieren, waren DC zur MHC-I und MHC-II-vermittelten Präsentation sowohl in den Peyer-Plaques als auch in der Milz in der Lage. Die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation deutet auf eine direkte Expression des plasmidkodierten Antigens hin. Dagegen geht die MHC-II-vermittelte Präsentation durch DC möglicherweise auf einen als *crosspriming* bezeichneten Vorgang zurück, bei dem Salmonellen-infizierte apoptotische Zellen von DC phagozytiert und anschließend prozessiert werden. Wahrscheinlich spielt die Adjuvanzwirkung apoptotischer Zelltrümmer bei der Immunisierung mit einer Salmonellen-DNA-Vakzine eine wichtige Rolle (Yrlid und Wick 2000; Weiss und Krusch 2001). Der genaue Mechanismus der Translokation von Plasmid-DNA aus der bakteriellen Zelle in den Kern der infizierten Zelle ist nicht bekannt. Mehrere Voraussetzungen müssen erfüllt sein, damit ein effizienter DNA-Transfer stattfinden kann; i) Plasmid-DNA muss stabil und in hoher Kopienzahl in die Wirtszelle eingeschleust werden, ii) die bakterielle Zellhülle muss innerhalb der Wirtszelle zerstört werden, iii) die Plasmid-DNA muss dem phagosomalen Kompartiment entweichen, iv) das Zytoplasma passieren und v) durch die Kernmembran in den Zellkern eintreten (Abb. 4). Die Desintegration intrazellulärer Bakterien und damit die Freisetzung von Plasmid-DNA kann durch eine entsprechende Attenuierung des Impfstammes begünstigt werden (Sizemore et al. 1995). Möglicherweise wird die DNA, ähnlich zu anderen Makromolekülen, durch Vesikel aus dem Phagosom ausgeschleust und im Zytoplasma freigesetzt (Rodriguez et al. 1999). Im Gegensatz zu nicht-phagozytischen Zelllinien führte die *in vitro*-Infektion primärer Peritonealmakrophagen mit einem Salmonellen-DNA-Vektor zu einer Transgenexpression (Darji et al. 1997), jedoch konnten diese Ergebnisse in einem anderen Labor nicht reproduziert werden (Grillot-Courvalin et al. 2002). Die Integration der LLO-Sekretionsdeterminante in den Stamm SL7207, basierend auf dem *E.coli-hlyA*-Transporter, führt zur teilweisen Freisetzung der Salmonellen aus dem Phagosom in das Zytoplasma (Gentshev et al. 1995) sowie zu einem nachweisbaren DNA-Transfer (Catic et al. 1999; Grillot-Courvalin et al. 2002).



**Abb. 4: Phasen des Transfers eines eukaryontischen Expressionsplasmids aus Salmonellen in die infizierte Wirtszelle.** A) Zellinvasion plasmidtragender Salmonellen. B) Lyse der Bakterien in dem Phagosom. C) Freisetzung von Plasmid-DNA in das Zytoplasma durch Zerstörung der phagosomalen Membran. D) Kerntranslokation der Plasmid-DNA. E) Expression und Präsentation des plasmidkodierten Antigens.

Im Mausmodell wurde die Immunisierung gegen verschiedene Antigene mit einer oralen Salmonellen-DNA-Vakzine getestet. Gegen die bakteriellen Antigene LLO und ActA, beides Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*, genügte bereits eine einmalige orale Dosis zur Induktion spezifischer Antikörper sowie potenter zellulärer Immunantworten, wobei im Fall von LLO diese Immunität schützend war (Darji et al. 1997). Dabei wurden für beide Gene die ursprünglichen DNA-Sequenzen verwendet. Durch die Optimierung der DNA-Sequenz entsprechend der murinen Kodonverwendung wäre eine weitere Steigerung der Vakzinewirkung zu erwarten (Uchijima et al. 1998). Eine orale HIV-1-Env-DNA-Vakzine wurde erfolgreich zur Induktion einer mukosalen CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort verwendet (Shata et al. 2001). Da über 90% aller HIV-Infektionen über die genitalen Schleimhäute erfolgen, ist dies möglicherweise eine besonders geeignete Strategie für die Entwicklung einer präventiven HIV-Vakzine (Veazey et al. 2001; Belyakov et al. 2001). In verschiedenen Tumormodellen wurden schützende Immunantworten induziert. In der ersten erfolgreichen oralen DNA-Vakzinierung gegen ein aggressives Fibrosarkoma wurde *E.coli*-LacZ als tumorassoziiertes Antigen verwendet (Paglia et al. 1998). In einem Nierenkarzinommodell wurden verschiedene Impfstrategien verglichen, ebenfalls mit LacZ als tumorassoziiertem Antigen (Zoller und Christ 2001). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die orale Salmonellen-DNA-Vakzine gegenüber intramuskulärer DNA-Injektion oder intravenös verabreichten, antigenbeladenen DC am effektivsten CTL-Antworten stimuliert. Mit einem Prime-Boost-Protokoll, in dem die orale DNA-Vakzine vor antigenbeladenen DC verabreicht wurde, konnte durch aktivierte systemische Th1-CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die beste Anti-Tumorimmunität induziert werden. Weitere Verbesserungen der Salmonellen-DNA-Vakzine wurden z.B. durch die Fusion des Tumorantigens mit Ubiquitin oder mit dem CD40-Liganden (CD40L) sowie durch eine gekoppelte IL-2-Therapie erreicht (Xiang et al. 2000; Niethammer et al. 2001; Xiang et al. 2001). Darüber hinaus sind Salmonellen auch für rein tumortherapeutische Ansätze von großem Interesse (Bermudes et al. 2002). Die orale, Salmonellen-vermittelte Verabreichung eines eukaryontischen Expressionsplasmids für CD40L schützte vor der Etablierung eines B-Zelllymphoms in der Maus (Urashima et al. 2000). Eine weitere Form der Tumorthherapie wurde durch die Selektion tumorinvasiver Salmonellen möglich (Pawelek et al. 1997). Bei systemischer Gabe akkumulieren diese Salmonellen präferentiell im Tumor und verlangsamen dessen Wachstum. Diese Bakterien sind in der Lage, Therapeutika in Form von Protein, möglicherweise auch Plasmid-DNA, lokal im Tumor freizusetzen (Zheng et al. 2000). Erste Ansätze zur Korrektur genetischer Defekte mittels bakterieller DNA-Vektorsysteme wurden unternommen. Ein Beispiel ist die Komplementierung eines IFN $\gamma$ -Gendefekts in der Maus durch die orale Gabe eines Salmonellen-Vektors mit der eukaryontischen Expressionskassette für das korrekte Transgen (Paglia et al. 2000).



### 3.5 Zielstellung

Die Zielstellung für die vorliegende Arbeit war die Optimierung von Salmonellen-Impfstämmen für den DNA-Transfer in APC des darmassoziierten Lymphgewebes und damit die Entwicklung einer wirksamen, sicheren und kostengünstigen Methode der oralen genetischen Vakzinierung für verschiedene prophylaktische und therapeutische Ansätze. Da der genaue Mechanismus des DNA-Transfers aus der bakteriellen Zelle in den Kern der infizierten Wirtszelle nicht bekannt ist, wurden mehrere Ansätze verfolgt, um die potentiellen Barrieren für den Transfer der Plasmid-DNA zu überwinden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Konstruktion und Evaluierung von neuen Salmonellen-Impfstämmen, die aktiv Plasmid-DNA *in vitro* freisetzen können. Zunächst sollte getestet werden, ob Salmonellen eukaryontische Expressionsplasmide als filamentöse Phagenpartikel verpacken können und deren Sekretion zur Transfektion einer infizierten Wirtszelle führt. Alternativ sollte ein spontan-induzierbares Autolysesystem für Salmonellen, basierend auf einem neuartigen ZPES, konstruiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob neben Plasmid-DNA auch koexprimierte Fremdproteine bei der bakteriellen Lyse entlassen werden und für die weitere Beförderung der Plasmid-DNA in den Kern der Wirtszelle nützlich sind. Die Koexpression von LLO wurde zunächst favorisiert, um die Übertragung der Plasmid-DNA aus dem Phagosom in das Zytoplasma zu steigern. Ein wichtiges Kriterium bei der Konstruktion neuer Systeme war die Gewährleistung ihrer stabilen Erhaltung in dem Impfstamm. Die neuen Impfstämme sollten schließlich im Mausmodell hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in der Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten evaluiert werden. Dabei sollten die neuen Stämme mit dem herkömmlichen Impfstamm sowie weiteren Immunisierungsrouten verglichen werden. Das HBsAg-Protein sollte dabei als Modellantigen dienen.

## 4 Material

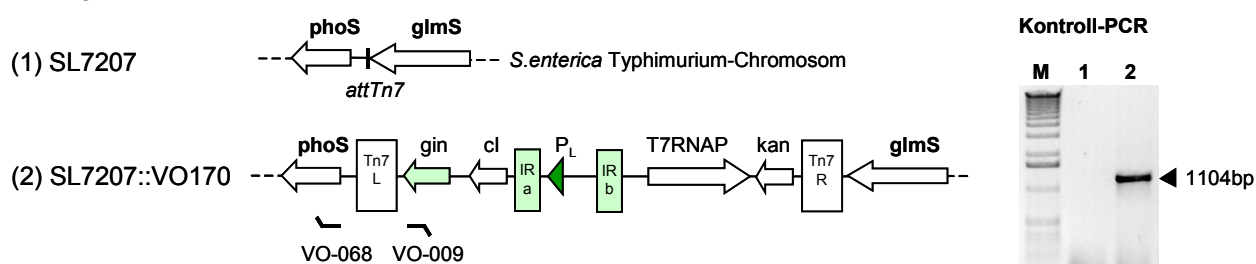
### 4.1 Bakterienstämme und Bakteriophagen

Stamm (Sammlungs-Nr.)	Genotyp, Referenz
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (E142)	F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> $\lambda$ -; GIBCO/BRL (Paisley, Schottland)
<i>E.coli</i> JM109 (E216)	F' <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta(lacZ)$ M15, $\Delta(lac-proAB)$ , <i>e14-</i> $\lambda$ -; (Yanisch-Perron et al. 1985)
<i>E.coli</i> SM $\lambda$ pir (E97)	<i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu, Kan <sup>R</sup> $\lambda$ pir; (Miller und Mekalanos 1988)
<i>S.enterica</i> Typhimurium SL3261 (X82)	<i>hisG46</i> , $\Delta 407[aroA544::Tn10]$ , Tet <sup>S</sup> , Fus <sup>R</sup> , Strep <sup>R</sup> ; (Hoiseth und Stocker 1981); zur Verfügung gestellt von Dr. B.A.D. Stocker
<i>S.enterica</i> Typhimurium SL7207 (X163)	<i>hisG46</i> , $\Delta 407[aroA544::Tn10]$ , Tet <sup>S</sup> , Strep <sup>R</sup> ; zur Verfügung gestellt von Dr. B.A.D. Stocker
<i>S.enterica</i> Typhimurium SL3261::VO170 (X142)	SL3261 [Tn7::( <i>cl</i> , <i>gin</i> , P <sub>PL</sub> , T7RNAP, <i>kan</i> )], Kan <sup>R</sup> , Strep <sup>R</sup> ; chromosomal integriertes ZPES des Plasmids pVO170; Konstruktion wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben; Dr. V. Spehr unveröffentlicht
<i>S.enterica</i> Typhimurium SL7207::VO170 (X164)	SL7207 [Tn7::( <i>cl</i> , <i>gin</i> , P <sub>PL</sub> , T7RNAP, <i>kan</i> )], Kan <sup>R</sup> , Strep <sup>R</sup> ; chromosomal integriertes ZPES des Plasmids pVO170; Konstruktion beschrieben in Abschnitt 2.1.1
<i>S.enterica</i> Typhimurium SL3261::VO330B::YZ220 (X138)	SL3261 [Tn5::( <i>P</i> <sub>bla</sub> - <i>gin</i> , <i>cam</i> )], [Tn7::( <i>cl</i> , <i>gin</i> , P <sub>PL</sub> , T7RNAP, <i>kan</i> )], Cam <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Strep <sup>R</sup> ; chromosomal integrierte konstitutive Gin-Expressionskassette des Plasmids pVO330B (Dr. V. Spehr unveröffentlicht) sowie chromosomal integriertes ZPES des Plasmids pYZ220 (Dr. Z. X. Yan unveröffentlicht); Aufbau der invertierbaren Kassette dargestellt in Abb. 14
<i>S.enterica</i> Typhimurium $\chi$ 4072 (X167)	<i>gyrA1816</i> , $\Delta asdA1$ , $\Delta crp-1$ , $\Delta cya-1$ , $\Delta[zhf-4::Tn10]$ ; (Nakayama et al. 1988); zur Verfügung gestellt von Dr. Roy Curtiss III

Phage (Sammlungs-Nr.)	Referenz
M13KO7 (H3274)	Helferphage; Pharmacia (Uppsala, Schweden)
$\phi$ X174 (H3275)	Phagenpräparation; zur Verfügung gestellt von Dr. Klaus Geider

#### 4.1.1 Konstruktion des Stammes SL7207::VO170

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ZPES des Plasmids pVO170 Tn7-vermittelt in den *aroA*-attenuierten *S. enterica* Typhimurium-Stamm SL7207 übertragen (Abb. 5). Die Tn7-vermittelte Transposition erfolgt gerichtet in die transkriptionell inaktive Stelle *attTn7* des Chromosoms. Da diese Stelle im Chromosom gramnegativer Bakterien konserviert ist, eignet sie sich für die vergleichbare chromosomale Integrationen genetischer Module vor dem Hintergrund verschiedener Stämme (Craig 1991). Das ZPES des Plasmids pVO170 trägt im Gegensatz zu dem System pYZ84 (Yan und Meyer 1996) ein größeres invertierbares Fragment (Dr. V. Spehr, unveröffentlicht). Die korrekte chromosomale Integration selektierter Klone wurde durch PCR bestätigt (Abb. 5).



**Abb. 5: Tn7-vermittelte Integration der ZPES-Kassette des Plasmids pVO170 in den Stamm SL7207.** Die Tn7-spezifische Integrationsstelle *attTn7* befindet sich zwischen den Genen *phoS* und *glmS* des bakteriellen Chromosoms. Die PCR mit dem Primerpaar VO9/68 amplifiziert das 1104bp-Fragment zwischen *phoS* und *gin* (Invertase) und bestätigt somit die korrekte chromosomale Integration des selektierten Klons.

## 4.2 Säugerzelllinien

Zelllinie	Beschreibung, Referenz
COS7	Nierenzelllinie, gewonnen aus der Grünen Meerkatze, transfiziert mit einer SV40-Mutante; ATCC CRL-1651
J774A.1	Makrophagen-Zelllinie, gewonnen aus einer BALB/c-Maus; ATCC TIB 67
P815	Mastocytoma-Zelllinie, gewonnen aus dem Tumor einer DBA/2-Maus; H-2K <sup>d</sup> ; ATCC TIB 64
P815-S	stabil mit HBsAg transfizierte P815-Zelllinie; (Schirmbeck et al. 1994), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jörg Reimann.

### 4.3 Versuchstiere

In den Immunisierungsexperimenten wurden 6-8 Wochen alte, weibliche Tiere des Mauseinzuchtstammes BALB/c (H-2K<sup>d</sup>) eingesetzt. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen entsprechend den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes in der Anlage der Zentralen Versuchstierzucht des Bundesamtes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Berlin (BgVV).

### 4.4 Nukleinsäuren

#### 4.4.1 Oligonukleotide

Name	Matrize	Sequenz ( in 5'-3'-Richtung )
HLL27	φX174	GGATATCCATATGGTACGCTGGACTTTGTG
HLL28	φX174	GGATATCGGATCCATCACTCCTTCCGCACG
HLL32	pLis4	CGGGATCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG ATATACATATGGATGCATCTGCATTCAATA
HLL34	pACYC184	GGAATTCATCGATGACGTCGCGTAACGGCAAAGC
HLL35	pACYC184	GGAATTCAGGCCTAGTACTCTAGCCGGGTCCTCAAC
HLL36	pLis4	CGGGATCCTCTAGATTTTCAGTGCAATTTAGCATGCTTATTAT TCGATTGGATTATCTAC
HLL37	pHL117	GATATCAGGCCTAGATCTTCATCTTATTAATCAGATAAA
HLL38	pHL117	GGATATCAGGCCTAGATCTGAATGGTGCATGCTTA
HLL51	<i>Thermotoga maritima</i> gDNA	GGATATCGCTAGCCATATGAACAAGAAGGAACTCA
HLL52	<i>Thermotoga maritima</i> gDNA	GGATATCCATGGCTCGAGCCTATCACTTGACCTTCTC
HLL53	pDKL02	GAGGCCTCTAGACATATGCCAGAAAAACATGA
HLL54	pDKL02	GAGGCCTGGATCCTCATCATACATCAATCTCTCTGA
VO9	gin	GCTCTAGAGGATCCTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTGA TTGGCTATGT

VO68	phoS	AAGGCACCGACGTTGACCA
VO75	pLysS	GAGATATCGCTAGCTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTC GTGTACAGTTTAA
VO76	pLysS	CTGATATCTAGATTATCCACGGTCAGAAGTGACC

Die Oligonukleotide wurden von der Firma GIBCO/BRL (Paisley, Schottland) synthetisiert. dNTP's für die PCR wurden von Amersham (Little Chalfont, England) bezogen.

#### 4.4.2 Ausgangsplasmide und sonstige DNA

Plasmide (Sammlungs-Nr.)	Referenz
pACYC177 (H2678)	Niedrigkopienzahlplasmid mit dem p15A Ursprung; (Chang und Cohen 1978)
pACYC184 (H1942)	Niedrigkopienzahlplasmid mit dem p15A Ursprung; (Chang und Cohen 1978)
pcDNA3 (H3117)	Eukaryontisches Expressionsplasmid; Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pCMV $\beta$ (L72)	Eukaryontisches <i>lacZ</i> -Expressionsplasmid; Clontech (Palo Alto, USA)
pCMV-S (L71)	Eukaryontisches HBsAg-Expressionsplasmid; (Davis et al. 1993); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Robert Whalen
pEGFP-C1 (H3269)	Eukaryontisches GFP-Expressionsplasmid; Clontech (Palo Alto, USA)
pET-11a (H3126)	Plasmid zur induzierbaren T7RNAP-vermittelten Expression, (Dubendorff und Studier 1991), Novagen (Madison, USA)
pDKL02 (L80)	Plasmid mit dem $\lambda$ -Lyseoperon; (Kloos et al. 1994); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Strätz
pILH-1 (H3264)	Plasmid mit dem <i>E.coli-hlyA</i> -System zur Sekretion von LLO; (Gentshev et al. 1995); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jürgen Hess
pKenGFP1 (H3225)	GFP-Expressionsplasmid; (Cormack et al. 1996)

pLis4 (H3226)	LLO-Expressionsplasmid; (Cossart et al. 1989)
pLysS (E217)	T7-Lysozym-Expressionsplasmid; (Studier 1991)
pSLRSVbpA (H3262)	Eukaryontisches Expressionsplasmid mit der 3'-LTR des Rous Sarcoma Virus; (Loessner 1996)
pSL1190 (H3260)	Superlinker Phagemid; Pharmacia (Uppsala, Schweden)
pVO170 (H3068)	miniTn7::( <i>cl</i> , <i>gin</i> , P <sub>PL</sub> , T7RNAP, <i>kan</i> ), Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ; Derivat des ZPES-Plasmids pYZ84 (Yan und Meyer 1996); Dr. V. Spehr unveröffentlicht
pVO197 (H2993)	pET11a-abgeleitetes GFP-Expressionsplasmid; (Spehr et al. 2000)
pVO232 (H3270)	Bakterielles GFP-Expressionsplasmid mit dem $\beta$ -Laktamase-Promotor; Dr. V. Spehr unveröffentlicht
pVO252 (H3271)	Bakterielles Arabinose-induzierbares GFP-Expressionsplasmid; Dr. V. Spehr unveröffentlicht
pVO641b (H3071)	Siehe Abschnitt 2.4.2.3. und Abb. 7
pUC-19 (H2687)	Hochkopienzahlplasmid mit dem ColE1 Ursprung; (Yanisch-Perron et al. 1985)
pUX-BF13 (H3268)	Tn7-Helferplasmid; (Bao et al. 1991)

#### Sonstige DNA

<i>T.maritima</i> gDNA	Genomische DNA von <i>Thermotoga maritima</i> ; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Arnulf Kletzin
1 Kb DNA Ladder	DNA-Marker; GIBCO/BRL (Paisley, Schottland)

#### 4.4.3 Übersicht klonierter Plasmide

Plasmide (Sammlungs-Nr.)	Beschreibung
pHL4 (H3263)	Amp <sup>R</sup> , pCMV $\beta$ -abgeleitet, intergene Region von M13
pHL40 (L73)	Amp <sup>R</sup> , pSLRSVbpA-abgeleitet, <i>gfp</i>

pHL102 (L74)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, Gen-E
pHL108n (L76)	Amp <sup>R</sup> , pVO252-abgeleitet, <i>hly</i>
pHL111 (L75)	Tet <sup>R</sup> , pACYC184-abgeleitet, Gen-E
pHL117 (H3272)	Cam <sup>R</sup> , pACYC184-abgeleitet, <i>hly</i>
pHL120a (H3273)	Tet <sup>R</sup> , pACYC184-abgeleitet, Gen-E, <i>hly</i>
pHL121 (L77)	Tet <sup>R</sup> , pACYC184-abgeleitet, <i>hly</i>
pHL136a (L78)	Kan <sup>R</sup> , pEGFP-C1-abgeleitet, <i>asd</i>
pHL138 (L79)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, Gen-E, <i>hly</i>
pHL167b (L81)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, $\lambda$ -Lyseoperon
pHL174 (L82)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, $\lambda$ -Lyseoperon, <i>lys</i>
pHL175 (L83)	Amp <sup>R</sup> , pCMV-S-abgeleitet, $\lambda$ -Lyseoperon-Kassette, HBsAg-Kassette
pHL176a (L91)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, Gen-E, <i>gfp</i>
pHL176c (L92)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, Mini $\lambda$ -Lyseoperon, <i>gfp</i>
pHL180 (L84)	Amp <sup>R</sup> , pVO232-abgeleitet, TmHU-Gen
pHL182 (L87)	Amp <sup>R</sup> , pCMV-S-abgeleitet, Gen-E-Kassette, HBsAg-Kassette, TmHU-Kassette
pHL183 (L85)	Amp <sup>R</sup> , pCMV-S-abgeleitet, $\lambda$ -Lyseoperon-Kassette, HBsAg-Kassette, TmHU-Kassette
pHL184 (L86)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, Mini $\lambda$ -Lyseoperon
pHL187a (L90)	Amp <sup>R</sup> , pCMV-S-abgeleitet, Mini $\lambda$ -Lyseoperon-Kassette, HBsAg-Kassette, TmHU-Kassette
pHL188 (L88)	Amp <sup>R</sup> , pET11a-abgeleitet, Mini $\lambda$ -Lyseoperon-Kassette

#### 4.4.3.1 Konstruktion der Reporterplasmide

Die eukaryontischen Reporterplasmide pEGFP-C1 und pCMV $\beta$  können in *E.coli* nicht mit dem Helferphagen M13KO7 als Phagenpartikel verpackt werden. Das verpackbare eukaryontische LacZ-Expressionsplasmid pHL40 entstand durch Insertion der intergenen Region des M13-Phagen aus dem Plasmid pSL1190 in pCMV $\beta$  über die Restriktionsstellen *EcoRI* und *ScaI*. Das GFP-Phagemid pHL4 entstand durch die Insertion des GFP-Gens aus dem Plasmid pKenGFP1 in die eukaryontische Expressionskassette des Plasmids pSLRSVbpA über die Restriktionsstellen *Asp718* und *PstI*. Die *asd*-Kassette des Plasmids pYA280 wurde als *BglII*-Fragment gewonnen und anschließend mit Klenow-aufgefüllten Enden in das partiell *SspI*-geschnittene GFP-Expressionsplasmid pEGFP-C1 eingefügt (pHL136a).

#### 4.4.3.2 Konstrukte des autolytischen Systems

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Konstrukte basieren auf Vektoren niedriger Kopienzahl (10-20 Kopien je Bakterium). Das Lysegen E des Phagen  $\phi$ X174 wurde mit dem Primerpaar HLL27/28 aus DNA des Phagen amplifiziert. Die Klonierung des PCR-Fragments erfolgte über die Restriktionstellen *NdeI*-*BamHI* in das pET11a-abgeleitete GFP-Expressionsplasmid pVO197 und ergab das Plasmid pHL102. Das vollständige  $\lambda$ -Lyseoperon wurde aus dem Plasmid pDKL02 durch den Restriktionsverdau *EcoRI*-*BamHI* gewonnen und die Einzelstrangenden des Fragments mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Dieses Fragment wurde mit dem *NdeI*-*SmaI* geschnittenen, Klenow-Enzym aufgefüllten Fragment des Vektors pVO197 ligiert und ergab das Plasmid pHL167b. Die PCR des verkleinerten S-Gens (S105) und des Gens R (Mini $\lambda$ ) aus dem Plasmid pDKL02 erfolgte mit dem Primerpaar HLL53/54 und wurde ebenfalls über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in das Plasmid pVO197 inseriert. Dieses Konstrukt erhielt den Namen pHL184. Die Konstrukte pHL176a und pHL176c entstanden durch Insertion des *BamHI*-*BglII*-Fragments des Plasmids pVO197 in die mit *BamHI* geöffneten Vektoren pHL102 und pHL184. Gen-E wurde in den pUC-kompatiblen Niedrigkopienzahlvektor pACYC184 umklont, um die gemeinsame Erhaltung des Lyseplasmids und des eukaryontischen Expressionsplasmids zu erreichen. Mit dem Primerpaar HLL34/35 wurde der p15a-Replikationsursprung sowie das Tetrazyklinresistenzgen des Plasmids pACYC184 amplifiziert und das Produkt mit *EcoRI* und *ScaI* geschnitten. Mit einem *EcoRI*-*NruI*-Restriktionsverdau wurde die Gen-E-Kassette einschließlich *lacI* aus pHL102 gewonnen und mit dem PCR-Produkt zu dem Plasmid pHL111 ligiert. Die Integration einer konstitutiven Expressionskassette für LLO in das Plasmid pHL111 erforderte mehrere Klonierungsschritte. Das LLO-kodierende Gen *hly* wurde zunächst mit den Primern HLL32/36 aus dem Plasmid pLis4 amplifiziert und in das Plasmid pVO252 über die Schnittstellen *NdeI*-*SphI* zwischenklont (pHL108n). Anschließend erfolgte die Umklonierung von *hly* unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors des Tetrazyklings (Ptet) des Plasmids pACYC184. Dazu wurde der Vektor mit den Enzymen *EcoRV* und *SphI* geöffnet und das *SmaI*-*SphI*-Fragment des Plasmids pHL108n inseriert. Aus dem resultierenden Plasmid pHL117 wurde mittels PCR (Primer HLL37/38) die LLO-Expressionskassette gewonnen, mit *BglII* verdaut und in das mit



*Bgl*II und *Bam*HI partiell verdaut Plasmid pHL111 eingefügt. Das Zwischenprodukt pHL121 wurde erneut mit *Bgl*II geöffnet und das aus dem Plasmid pHL111 stammende Gen-E-tragende *Bgl*II-*Bam*HI-Fragment eingefügt. Aus dem resultierenden Plasmid pHL120a wurde die Gen E-*hly*-Kassette über die Schnittstellen für *Aat*II und *Bgl*II in den pET11a-Vektor übertragen (pHL138).

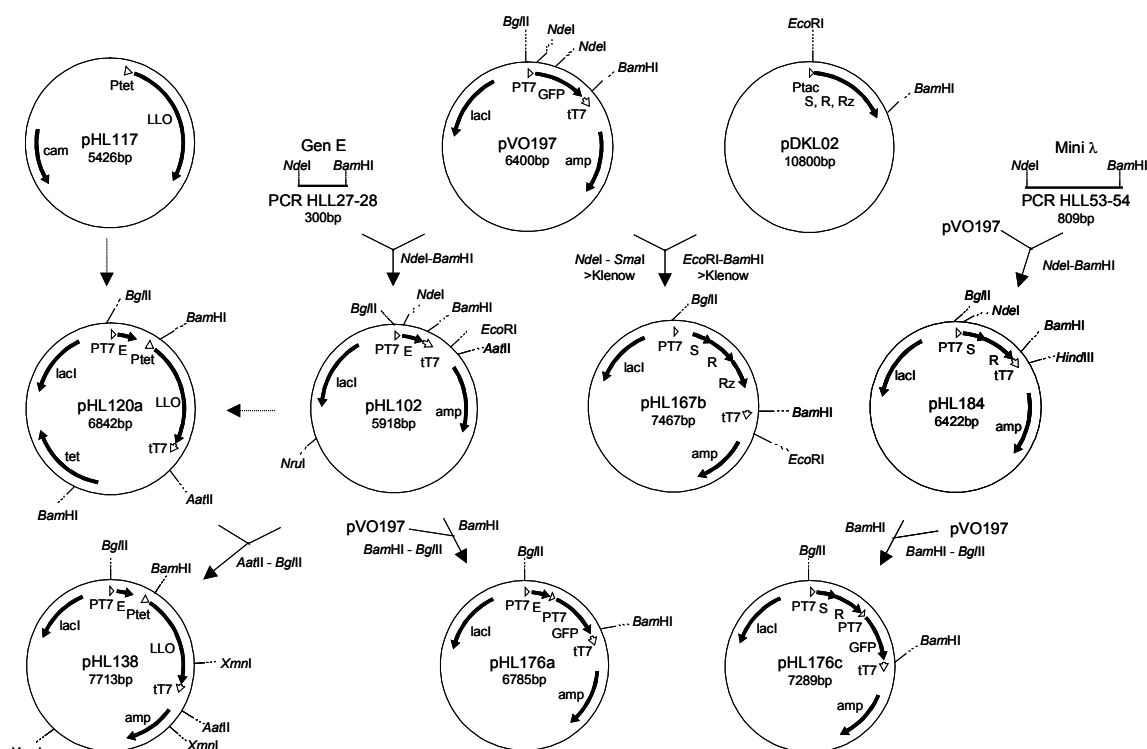
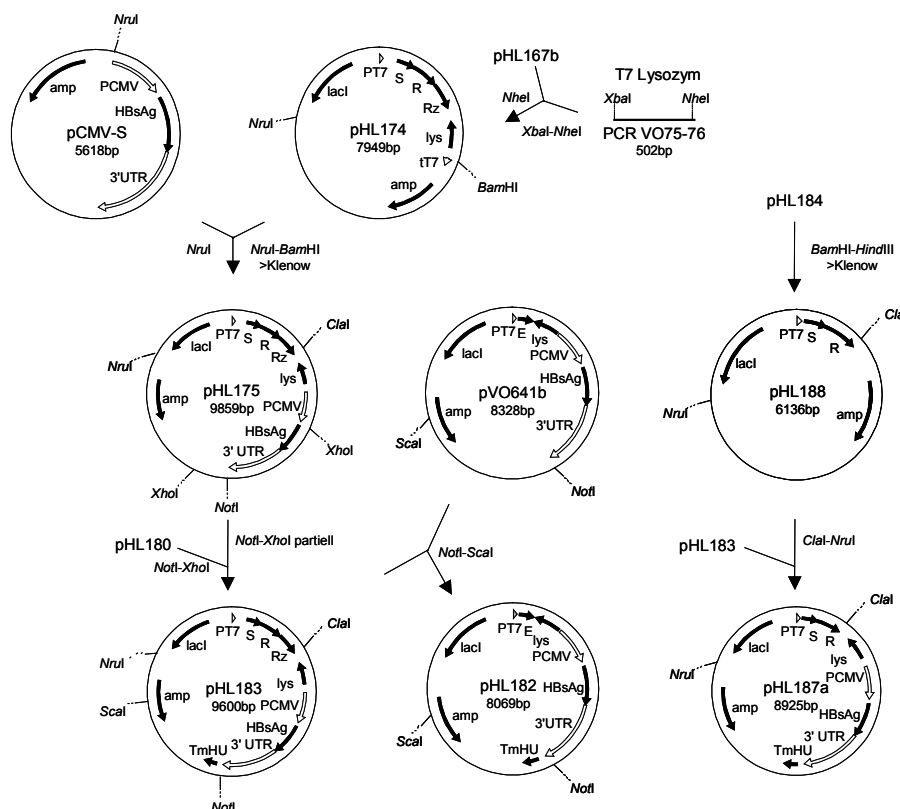


Abb. 6: Klonierung der Plasmide für das Autolysesystem.

#### 4.4.3.3 Plasmide mit der eukaryontischen HBsAg-Expressionskassette

Der eukaryontische HBsAg-Expressionsvektor pCMV-S ist ein pUC-abgeleiteter Hochkopienzahlvektor (Davis et al. 1993). In dieses Plasmid wurde die jeweilige bakterielle Lysedeterminante, eine T7-Lysozym- und eine TmHU-Expressionskassette integriert. Zunächst wurde die T7-Lysozym-Expressionskassette aus dem Plasmid pLysS mit dem Primerpaar VO75-76 amplifiziert (Spehr et al. 2000), das Fragment mit den Enzymen *Xba*I und *Nhe*I verdaut und in das mit *Nhe*I geöffnete Plasmid pHL167b kloniert. Das Produkt pHL174 wurde mit *Nru*I und *Bam*HI geschnitten, die Einzelstrangenden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und in das mit *Nru*I geöffnete Plasmid pCMV-S eingefügt (pHL175). TmHU wurde mit den Primern HLL51/52 aus chromosomaler DNA des Bakteriums *Thermotoga maritima* amplifiziert, das Fragment mit *Nde*I und *Nco*I geschnitten und über diese Schnittstellen das GFP-Gen in dem Plasmid pVO232 ersetzt (pHL180). Das TmHU-Gen wurde dadurch unter die Kontrolle des  $\beta$ -Laktamase-Promotors (Pbla) platziert. Die Pbla-TmHU-Kassette wurde mittels *Not*I und *Xho*I in das Plasmid pHL175 übertragen (pHL183). Das Plasmid pVO641b trägt Gen-E in gleicher Position wie pHL175 das  $\lambda$ -Lyseoperons. Über *Not*I und *Sca*I wurde die TmHU-Kassette aus pHL183 in pVO641b überführt (pHL182). Das vollständige  $\lambda$ -Lyseoperon des Plasmids pHL175

wurde außerdem durch Miniλ ersetzt. Zunächst wurde der T7-Terminator des Miniλ-Plasmids pHL184 durch einen *Bam*HI-*Hind*III-Verdau mit anschließender Klenow-Reaktion und Religation entfernt (pHL188). Aus diesem Plasmid wurde das kleinere Fragment des *Cla*I-*Nru*I-Verdaus isoliert und in den mit gleichen Enzymen geöffneten Vektor pHL183 inseriert (pHL187a).



**Abb. 7: Klonierung der eukaryontischen HBsAg-Expressionsplasmide für die autolytischen Impfstämme**

#### 4.5 Enzyme, Antikörper, und Polypeptide

Restriktionsendonukleasen wurden von Roche (Mannheim, Deutschland), Amersham (Little Chalfont, England) und NEB (Frankfurt/Main, Deutschland) bezogen. Die T4-DNA-Ligase, das Klenow-Enzym, die alkalische Phosphatase, die Taq-DNA-Polymerase sowie das *Expand High Fidelity* PCR-System (Gemisch der Polymerasen Taq und Pwo) kamen von Roche (Mannheim, Deutschland). RNaseA wurde von Qiagen (Hilden, Deutschland) und DNaseI von Sigma (München, Deutschland) bezogen. Der aufgereinigte monoklonale Antikörper B62-FE2 (1,6 mg/ml), spezifisch für das Haupthüllprotein gVIII von Ff-Phagen, wurde freundlicherweise von Dr. Burkhard Micheel zur Verfügung gestellt (Micheel et al. 1994). Der gereinigte LLO-spezifische monoklonale Antikörper D21-1-4 (1 mg/ml) wurde freundlicherweise von Dr. Pascale Cossart bereitgestellt (Nato et al. 1991). Das polyklonale Kaninchenserum gegen HBsAg (Katalog-Nr. B65811R) stammte von der Firma Dunn (Asbach, Deutschland). Das polyspezifische Testreagenz Anti-Salmonella-I (Katalog-Nr. TS-1111) wurde von der Firma Sifin (Berlin, Deutschland) bezogen. Die verwendete Charge dieses Antikörpers 780795 ist ein Gemisch verschiedener Kaninchen-Seren und wurde für die Immunfluoreszenzfärbung

eingesetzt. Im Westernblot und im ELISA wurden als Zweitantikörper das Peroxidase- $\alpha$ -Maus-IgG-Konjugat NA931 sowie das Peroxidase- $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Konjugat NA934 aus dem ECL-Chemilumineszenz-Kit (Katalog-Nr. RPN 2108) der Firma Amersham (Little Chalfont, England) verwendet. In der Immunfluoreszenz wurden die Zweitantikörperkonjugate Alexa<sub>488</sub>-Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Katalog-Nr. A-11029) und Alexa<sub>488</sub>-Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG (Katalog-Nr. A-11034) von MoBiTec (Göttingen, Deutschland) sowie Cy3-Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG (Katalog-Nr. 111-165-144) von Diannova (Hamburg, Deutschland) verwendet. Für ELISA wurden die Zweitantikörperkonjugate Biotin-Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Katalog-Nr. B0529) und Peroxidase-Ziege- $\alpha$ -Maus-IgA (Katalog-Nr. A4789) sowie das ExtrAvidin-Alkaline-Phosphatase-Konjugat (Katalog-Nr. E2636) von Sigma (München, Deutschland) bezogen. Zur Quantifizierung von HBsAg-Protein in Zelllysaten wurde der kommerzielle Sandwich-ELISA „Bioelisa HBsAg“ der Firma Biokit (Barcelona, Spanien) verwendet. Das gereinigte HBsAg-Protein wurde großzügigerweise durch Dr. Vytautas Naktinis, Firma Biofa (Vilnius, Litauen) bereitgestellt. Das Protein war in Hefe exprimiert, aufgereinigt (Reinheit >95% in SDS-PAGE), in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in 0,05 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,9, 0,1 M NaCl, 1% Dextran 70 formuliert, steril filtriert und das Lyophilisat eines Milliliters in einer Glasampulle versiegelt worden. Dieses Lyophilisat wurde für Experimente in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst. Das L<sup>d</sup>-restriktierte CTL-Epitop S<sub>28-39</sub> des HBsAg-Proteins wurde als Peptid in der Form <sup>H<sub>2</sub>N</sup>-IPQSLDSWWTSL-COOH von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) mit 95%iger Reinheit synthetisiert. Das Lyophilisat wurde in PBS gelöst (Konzentration 1 mg/ml) und bei -20°C eingefroren. Murines IL2 wurde als Kulturüberstand IL2-sekretierender Zellen in einer Konzentration von 3000 U/ml gewonnen und als Mediumsupplement verwendet (Karasuyama und Melchers 1988). Als Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE wurde der LMW-Electrophoresis-Calibration-Kit (Katalog-Nr. 17-0446-01) der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) verwendet.

## 4.6 Puffer, Lösungen und Medien

### 4.6.1 Puffer und Lösungen für die Arbeit mit DNA

GET/Lysozym	50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8, ca. 4 µg/ml Lysozym
P2 (Lysepuffer)	0,2 N NaOH, 10 % SDS
P3 (Azetatpuffer)	5 M K-Acetat
TERNA	10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA
DNA-Probenpuffer	20% Glycerin, 50 mM EDTA, 0,5% N-Laurylsarkosin, 0,05% OrangeG
TAE-Puffer (1x)	50 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 18 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8

---

EtBr-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Restriktionspuffer	Kommerzielle Puffer, passend zu den verwendeten Enzymen
Nuklease-Puffer (10x)	0,5 M NaCl, 330 mM Na-Acetat, 0,3 mM ZnSO <sub>4</sub>

#### 4.6.2 Puffer und Lösungen für die Arbeit mit Proteinen

---

Acrylamid-Basis	30% (g/v) Acrylamid, 0,8% (g/v) Bisacrylamid in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,6% (g/v) SDS
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,6% (g/v) SDS
APS	10% (g/v) Ammoniumpersulfat
TEMED	0,1% N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Proteinprobenpuffer (2x)	Sammelgelpuffer und 30% (v/v) Glycerin, 3% (g/v) SDS, 0,05% (g/v) Bromphenolblau, 10% g/v Saccharose, 5% v/v β-Mercaptoethanol
Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin, 0,15% (g/v) SDS, pH 8,3
Coomassie-Färbelösung	0,25% (g/v) Brilliant Blue R250 (Coomassie), 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 30 min vermischen und anschließend filtrieren
Coomassie-Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Tris-gepufferte Saline (TBS, TBS-T, TBS-M)	TBS : 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl; TBS-T : TBS + 0,05% (v/v) Tween-20 in TBS; TBS-M : TBS + 5% (g/v) Magermilchpulver in TBS
Transferpuffer	Laufpuffer und 20% (v/v) Methanol
Bradfordlösung	100 mg Brilliant-Blue R250 (Coomassie) in 100 ml 50% (v/v) Ethanol, mit 100 ml 85% (v/v) Phosphorsäure mischen und anschließend mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auf 1l auffüllen, im Dunkeln aufbewahren
EDTA-Trypsininhibitor	50 mM EDTA, 0,1 mg/ml Trypsininhibitor (Katalog-Nr.T-9003, Sigma), 0,1% BSA in PBS, steril filtriert

---

PMSF-Lösung	100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in Ethanol, bei –20°C lagern
AP-Substratpuffer	50 mM NaHCO <sub>3</sub> , 2 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9
AP-Substrat	AP-Substratpuffer mit 0,2% (g/v) p-Nitrophenylphosphat
HRP-Substratpuffer	100 mM Natrium-Acetat, 12 mM Zitronensäure, pH 5
HRP-Substrat	HRP-Substratpuffer mit 0,01% (g/v) Orthophenyldiamine (zuvor gelöst in Methanol) und 0,01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Lyse-PBS	PBS mit 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 5,1

#### 4.6.3 Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien

---

LB	5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 200 mM NaCl, pH 7,5, auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auffüllen
2xYT	10 g Bacto-Hefeextrakt, 16 g Bacto-Trypton, 100 mM NaCl, pH 7,5, auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auffüllen
SOB	5 g Bacto-Hefeextrakt, 20 g Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, mit 5 N NaOH pH 7,0 einstellen, auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auffüllen, autoklavieren, vor Gebrauch Zugabe von 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub>
Medienplatten	Medium, 2 g/l Difco-Agar
Transformationspuffer	10 mM Pipes, 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, mit KOH pH 6,7 einstellen, Zugabe von 2,75 ml 1 M MnCl <sub>2</sub> , sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
PBS	137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7

#### 4.6.4 Medien, Zusätze und Lösungen für die Arbeit mit Säugerzellen

---

RPMI 1640 mit L-Glutamin	Standardmedium für Zelllinien (Katalog-Nr. 21875-034, GIBCO/BRL)
Komplettmedium	DMEM mit 4500 mM Glukose (Katalog-Nr. 41965-039, GIBCO/BRL), 10% iFKS, 1x MEM/NE-AA, 2 mM L-Glutamin, 10 mM Hepes, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 100 U Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1mM Natriumpyruvat

Opti-MEM I	Synthetisches Medium für Transfektionen, (Katalog-Nr. 51985-026, GIBCO/BRL)
Inaktiviertes Fötales Kälberserum (iFKS)	Fötales Kälberserum bei 56°C für 30 min zur Inaktivierung des Komplementsystems inkubiert
Pen/Strep (100x)	10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin
Glutamax-I (100x)	200 mM stabiles L-Glutamin, (Katalog-Nr. 35050-038, GIBCO/BRL)
MEMaa (100x)	Nicht-essentielle Aminosäuren (Katalog-Nr. 11140-035, GIBCO/BRL)
Trypsin-EDTA (10x)	0,5% (g/v) Trypsin, 0,2% (g/v) EDTA in 10x PBS (Katalog-Nr. L 2153, Biochrom), 1:10 in sterilem H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
DAC30	2,5 µg/µl DAC30 in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> , Eurogentec (Seraing, Belgien)
Trypanblau	0,175% (g/v) Trypanblau in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO in iFKS
Geneticin	50 mg/ml G418-Sulfat (Katalog-Nr. 10131-019, GIBCO/BRL)
Gentamicin	50 mg/ml Gentamicinsulfat (Katalog-Nr. 15750-037, GIBCO/BRL)
Mercaptoethanol (1000x)	50 mM 2-Mercaptoethanol Stammlösung (Katalog-Nr. 31350-010, GIBCO/BRL)
3% PFA	3% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,5
Proteaseinhibitor (7x)	1 Tablette <i>Roche complete</i> (Katalog-Nr. 1-836-170, Roche) in 1,5 ml PBS
Moviol-Einbettmedium	6 g Glycerin und 2,4 g Moviol 4-88 in 6 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 1h bei RT inkubieren, 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) zugeben, 10 min bei 50°C inkubieren, 15 min bei 7500 g zentrifugieren, bei 4°C aufbewahren
HBSS	<i>Hanks-buffered</i> Saline (Katalog-Nr. 14025-050, GIBCO/BRL)
Erythrozytenlysepuffer	0,16 M NH <sub>4</sub> Cl in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
PBS-P	0,1% (v/v) Triton-X-100/ 2% (g/v) BSA

Saccharose-PBS	5% (g/v) Saccharose in PBS zugeben, pH 7,5
Ketamin/Xylazin-Lösung	je 10% (v/v) Narketan®10 (Chassot, Ravensburg, Deutschland) und Xylazin®2% (Ceva, Düsseldorf, Deutschland) in PBS

#### 4.7 Chemikalien und Kits

Bezugsquellen waren : Antibiotika von Sigma (München, Deutschland), BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce (Rockford, IL, USA), <sup>51</sup>Chrom von Perkin Elmer (Boston, MA, USA), Diaminopimelische Säure von Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), DNA-Extraktionskits von Qiagen (Hilden, Deutschland), ECL-Chemilumineszenz-Kit von Amersham (Little Chalfont, England), Extrakte für Bakterienmedien von Difco (Detroit, MI, USA), Magermilchpulver von Glücksklee (Neustadt, Deutschland), Moviol 4-88 Sigma (München, Deutschland), Polyethylenglycol 6000 von Roth (Karlsruhe, Deutschland), Schafblut von Oxoid (Wesel, Deutschland), SeaKem-Agarose von Biozym (Oldendorf, Deutschland), Triton-X-100 von Merck (Darmstadt, Deutschland), Tween20 von Serva (Heidelberg, Deutschland). Bezugsquellen für allgemeine Laborchemikalien waren Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma (München, Deutschland).

#### 4.8 Spezielle Geräte und Materialien

Verwendet wurden : <sup>137</sup>Cs-Bestrahlungsgerät von MDS Nordion (Ottawa, Kanada), Einmalküvetten von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Einmalspritzen und Kanülen von B.Braun (Melsungen, Deutschland), Elektronenmikroskop Zeiss EM-10 (Oberkochen, Germany), Elektroporator und Elektroporationsküvetten von Biorad (München, Deutschland), ELISA-Platten Multisorb von Nunc (Wiesbaden, Deutschland), ELISA-Reader SpectraMax 250 von Molecular Devices (München, Deutschland), Feindosierungsspritze mit fester Nadel von B.Braun (Melsungen, Deutschland), Filterpapier und Membranfilter von Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland), Fluoreszenzmikroskop Axiovert, Zeiss (Oberkochen, Deutschland), Geldokumentationsanlage von Polaroid/Intas (Göttingen, Deutschland), Hämatokritkapillaren von Hirschmann (Eberstadt, Deutschland), inverses Phasenkontrastmikroskop X50 von Olympus (Hamburg, Deutschland), konfokales Mikroskop Leica TCS SP2 RS von Leica (Heidelberg, Deutschland), Nitrozellulosemembran von Millipore (Schwalbach, Deutschland), pH-Meter von WTW (Weilheim, Deutschland), Plastikmaterial von Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner (Solingen, Deutschland) und Nunc (Wiesbaden, Deutschland), Sequenzierer ABI 373A von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland), Spektrophotometer von Pharmacia (Uppsalla, Schweden), Thermal Cycler und Reaktionsgefäße für die PCR von Perkin Elmer (Boston, MA, USA), Trockenblotapparatur von Biotec-Fischer (Reiskirchen, Deutschland), Top-Count-Gerät NXT von Packard (Meriden, CT, USA), Zentrifugen von Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Heraeus (Hanau, Deutschland) und Sorvall (Göttingen, Deutschland).

#### **4.9 Software**

Verwendet wurden : Adobe Photoshop 6.0 von Adobe (Unterschleißheim, Deutschland), Clone Manager von Scientific Data (Durham, NC, USA), Graphpad-Prism 3.0 von GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, USA), Microsoft-Office von Microsoft (Verl, Deutschland), Reference Manager 8.0 von ISI ResearchSoft (Carlsbad, CA, USA).



## 5 Methoden

### 5.1 DNA-Arbeitstechniken

#### 5.1.1 Isolation von DNA

Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde im kleinen Maßstab mit dem Miniprep-Verfahren durch alkalische Lyse gewonnen (Birnboim und Doly 1979). Bakterien wurden über Nacht in 4 ml selektiven LB-Medium angezogen, 1,5 ml der stationären Kultur 5 min bei 3000 x *g* zentrifugiert, das Pellet in 100 µl GET/Lysozym-Lösung resuspendiert und 5 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer P2 zugegeben, der Ansatz vorsichtig geschüttelt und weitere 5 min inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µl eiskalter Kaliumazetat-Lösung (P3) wurden chromosomale DNA und Proteine ausgefällt und durch Zentrifugation bei 10000 x *g* abgetrennt. Die Nukleinsäuren des Überstandes wurden mit dem 3-fachen Volumen Ethanol bei –20°C für 30 min gefällt, 10 min bei 10000 x *g* zentrifugiert, das Pellet vorsichtig in 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 50 µl TE/RNA-Lösung 10 min bei 37°C zur Degradation von RNA inkubiert und schließlich bei –20°C eingefroren. Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Salmonellen, bakteriellen Kulturüberständen sowie Lysaten eukaryontischer Zellen erfolgte mit dem Qiagen Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll. Dabei wurde der optionale Waschschrift in PB-Puffer zur vollständigen Beseitigung von Nukleasen durchgeführt. Zur Präparation von Plasmid-DNA in Mengen bis 100 µg wurde der Qiagen Midiprep Kit und für die Präparation endotoxinfreier Plasmid-DNA für DNA-Vakzinierungen der Endofree Plasmid Maxi Kit entsprechend der Herstellerprotokolle verwendet. Für die Präparation von Einzelstrang-DNA aus Fφ-Phagenpartikeln wurde der Qiaprep Spin M13 Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Konzentration isolierter DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die OD von 1,000 in einer Quarzküvette mit 1 cm Durchmesser bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht 50 µg Doppelstrang-DNA/ml, 40 µg Einzelstrang-DNA oder RNA/ml sowie 20 µg Oligonukleotide/ml.

#### 5.1.2 Restriktionsverdau von DNA

Für Spaltung von DNA für analytische Zwecke oder zur Isolation bestimmter DNA-Fragmente wurden Restriktionsenzyme verschiedener Hersteller verwendet und die empfohlenen Pufferbedingungen gewählt. Die Ansätze wurden bei einer Enzymkonzentration von ca. 2 U/µg DNA für 2 h oder ÜN bei 37°C inkubiert. Ein präparativer Partialverdau wurde durchgeführt, wenn ein DNA-Molekül mehrere Restriktionsstellen eines Enzyms enthielt, jedoch die Herstellung des gewünschten Fragments nur die Spaltung an einer Stelle zuliess. Dazu wurden 3 Ansätze vorbereitet, das entsprechende Enzym in einer Konzentration von 0,5 U/µg DNA zugegeben und der Verdau auf dem Tisch für 1, 5 oder 10 min belassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe des DNA-Probenpuffers abgebrochen, die Proben in einem Agarose-Gel aufgetragen und entsprechend dem Muster die richtige Bande mit der höchsten Intensität ausgeschnitten. Bei Spaltungen mit Enzymen unterschiedlicher Pufferpräferenz wurde zuerst unter optimalen Bedingungen für das Nidrigsalzenzym verdaut und anschließend durch Zugabe des Hochsalzpuffers die Bedingungen für das zweite Enzym eingestellt.

### 5.1.3 Auffüllen 5'-überhängender Enden doppelsträngiger DNA

Das Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I von Roche wurde zum auffüllen 5'-überhängender Enden doppelsträngiger DNA verwendet. Dem Restriktionsansatz wurden 2,5 µl 1 mM dNTP und 2 U Klenow-Enzym zugesetzt und 15 min im 30°C-warmen Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch sofort anschließende gelelektrophoretische Auftrennung oder Reinigung über eine QIAquick-Spin-Säule von Qiagen (Hilden, Deutschland) beendet.

### 5.1.4 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Die Selbstligation des geöffneten Plasmidvektors wurde durch Dephosphorylierung der DNA-Enden mit Hilfe der alkalischen Phosphatase des Kälberdarms (CIP) von Roche (Mannheim, Deutschland) verhindert. Zu einem 20 µl Restriktionsansatz wurde 4 µl 10x CIP-Puffer zugegeben, 2 µl CIP und 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend sofort gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 5.1.5 Gelelektrophorese von DNA

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA wurden je nach Größe der zu erwartenden Fragmente 0,8-1,5%ige Agarosegele gegossen. Dazu wurde zur abgewogenen Agarose TAE-Puffer zugegeben, in einem Mikrowellenherd aufgeköcht und nach Abkühlen auf ca. 60°C 5 µl EtBr-Stammlösung/100 ml zugegeben. Diese Agaroselösung wurde in die Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesteckt. Die festen Gele wurden mit TAE-Puffer übergossen und die mit DNA- Probenpuffer versetzten Proben in die Geltaschen gefüllt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Banden wurde 0,5 µg des 1kb-Ladder-Markers von GIBCO/BRL (Paisley, Schottland) mit aufgetragen. Die Laufzeit betrug ca. 1 h bei 110 V angelegter Spannung. Die Banden wurden unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit dem Videosystem von Polaroid/Intas dokumentiert.

### 5.1.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Lösungen

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionsansätzen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet und die DNA mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> eluiert.

### 5.1.7 Ligation

Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl angesetzt. Dazu wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>-eluierte Insert- und Vektorfragmente in einem molaren Verhältnis von ca. 5:1 gemischt, 2 µl der T4-Ligase von Roche (1U/µl) und 2 µl des mitgelieferten 10x Ligationspuffers zugegeben. Der Ligationsansatz wurde entweder 3 h auf dem Tisch oder ÜN im Wasserbad bei 14°C inkubiert.

### 5.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente wurde mit dem Thermal Cycler von Perkin Elmer in einem Gesamtvolumen von 50 µl in dünnwandigen Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Die analytische PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 100 pmol je Primer, 10 mM Tris-Cl, pH 9, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 2 U Taq-Polymerase. Als Matrize wurden entweder ca. 30 ng DNA oder direkt 5 µl einer ÜN-Bakterienkultur eingesetzt. Die Amplifizierung von Fragmenten für die Klonierung erfolgte mit dem *Expand High Fidelity* PCR-System von Roche unter Verwendung des mitgelieferten Puffers. Dieses System ist ein Gemisch der Polymerasen Taq und Pwo. Aufgrund der 3'-5' Exonukleaseaktivität von Pwo ist die Fehlerrate gegenüber Taq ca. 3-fach reduziert, jedoch bleibt die hohe Synthesegeschwindigkeit erhalten. Die PCR begann mit einer 3-minütigen Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 25-35 Zyklen. Während der Zyklen erfolgte die Denaturierung für 10 s bei 94°C, die Hybridisierung für 15 s bei 50-60°C in Anhängigkeit von den Primereigenschaften und die Polymerisation für 30 s bei 72°C. Nach Beendigung der Zyklen wurde der Ansatz zur Kettenverlängerung weitere 7 min bei 72°C inkubiert.

### 5.1.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Sanger-Methode und wurde unter Verwendung fluoreszenzmarkierter ddNTPs (Didesoxynucleotide) zur Erzeugung des Kettenabbruchs durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurde ein Taq-Dyedeoxy-Cycle-Sequencing-Kit verwendet und die Signale des Sequenziergels mit dem ABI 373A Scanner von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) gelesen. Für die Sequenzierreaktion wurde jeweils 500 ng säulengereinigte Plasmid-DNA und 10 pmol eines geeigneten Oligonukleotids eingesetzt.

## 5.2 Proteinanalytische Methoden

### 5.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamid-Gele wurden nach dem Rezept von Laemmli gegossen (Laemmli 1970). Ansätze zum Gießen zweier 12,5%iger Trenngele in einer Biorad Mini-Protean-Gelkammer enthielten 2,66 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, 2 ml Trenngelpuffer, 3,33 ml 30%ige PAA-Lösung, 10 µl TEMED und 40 µl 10%ige APS-Lösung. Das frische Trenngel wurde vorsichtig mit Isopropanol überschichtet, 30 min zur Polymerisierung stehengelassen, der Probenkamm eingesetzt und schließlich das Sammelgel gegossen. Die Sammelgellösung enthielt 1,63 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, 0,63 ml Sammelgelpuffer, 0,38 ml 30%ige PAA-Lösung, 10 µl TEMED und 17,5 µl 10%ige APS-Lösung. Die Proben wurden 1:1 in 2x Probenpuffer resuspendiert, 5 min gekocht und kurz bei hoher Fliehkraft zentrifugiert. Der Laufpuffer wurde in die Gelkammer eingefüllt und je Geltasche nicht mehr als 30 µg Protein aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der LMW Electrophoresis Calibration Kit der Firma Pharmacia verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 150 V.

### 5.2.2 Coomassie-Färbung

Zur unspezifischen Proteinfärbung wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese ca. 10 min in der Färbelösung agitiert und anschließend mehrfach in frischer Entfärbelösung gewaschen, bis das Gel zwischen den Spuren farblos war. Zur Konservierung wurden das Gel

in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen, anschließend in feuchte Einweckfolie gewickelt und zum Trocknen aufgespannt.

### 5.2.3 Immunoblot (Western)

Der Immunoblot dient dem spezifischen Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine. Die Proteine aus dem Polyacrylamidgel wurden auf eine  $0,45\ \mu\text{m}$  Nitrozellulose-Membran mit einer Semi-Dry-Blotapparatur von Biometra übertragen. Der Blotaufbau gestaltete sich folgendermaßen: zuerst wurden zwei Lagen 3MM-Whatman-Filterpapier in Transferpuffer getränkt und auf die untere Elektrode der Blotapparatur gelegt, darauf folgte die in Transferpuffer getränkte Nitrozellulose-Membran, dann das Gel und dann wieder zwei Lagen getränktes 3MM Filterpapier. Dabei entsprach die Größe des Filterpapiers und der Membran der des Gels. Mögliche Luftblasen zwischen den Lagen wurden mit einer Glaspipette ausgerollt. Danach wurde die obere Elektrode aufgesetzt und ein 90-minütiger Transfer bei ca.  $0,75\ \text{mA}/\text{cm}^2$  gestartet. Nach dem Transfer wurden die freien Proteinbindungsstellen der Membran durch eine 30-minütige Inkubation in TBS-M abgeblockt, nach einem Waschschrift in TBS-T der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 500 bis 1 : 2000 in TBS-M zugegeben und für 90 min bei RT oder ÜN bei  $4^\circ\text{C}$  in einem Falcon-Röhrchen (50 ml) auf einem Rollinkubator agitiert. Anschließend erfolgten 3 Waschschriffe je 5 min in TBS-T, gefolgt von der einstündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper, einem Anti-IgG-Peroxidase-Konjugat des ECL-Chemilumineszenz-Kits der Firma Amersham (Little Chalfont, England). Mit diesem Kit erfolgte nach erneutem Waschen die Detektion spezifischer Signale entsprechend dem Hersteller-Protokoll.

### 5.2.4 Trichlorazetat-Fällung von Proteinen

Proteine einer wässrigen Lösung wurden durch Zugabe von Trichlorazetat in einer Endkonzentration von 10% ausgefällt. Die Probe wurde für ca. 30 min auf Eis belassen, anschließend mit der Tischzentrifuge für 10 min bei  $10000 \times g$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Azeton gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 1x Probenpuffer resuspendiert. Bei einem gelben Farbumschlag wurde der saure pH-Wert durch den Dampf eines Ammoniak-getränkten Wattestäbchens erhöht, bis die blaue Farbe wiederhergestellt war.

### 5.2.5 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Im allgemeinen wurde die Bradford-Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe angewendet (Bradford 1976). Dazu wurde 1 ml filtrierter Bradfordlösung mit  $100\ \mu\text{l}$  Probenlösung versetzt und nach 10 min die  $\text{OD}_{595}$  bestimmt. Anhand der gemessenen Absorption wurde die Konzentration der Probe mittels einer BSA-Eichkurve bestimmt. Da diese Methode durch verschiedene Substanzen, z.B. Detergenzien, beeinträchtigt wird, wurde in einigen Fällen der mit Detergenzien kompatible BCA-Protein-Assay-Kit der Firma Pierce entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

### 5.3 Mikrobiologische Methoden

#### 5.3.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien wurden in der Regel in LB-Medium bei 37°C, 200 u/min propagiert. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 700 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur mit 300 µl Glycerin versetzt, auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert. Antibiotika wurden entsprechend den Stamm- oder Plasmid-vermittelten Resistenzen im Medium in folgenden Konzentrationen eingestellt : 100 µg/ml Amp, 30 µg/ml Kan, 30 µg/ml Strep, 12,5 µg/ml Tet und 25 µg/ml Cam. Zur Anzucht des Stammes *S. enterica* Typhimurium  $\chi$ 4072 wurde dem Medium Diaminopimelische Säure (DAP) in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Abweichende Wachstumsbedingungen sind in den folgenden Methoden beschrieben.

#### 5.3.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Klonierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  nach der Hitzeschockmethode transformiert. Die kompetenten Zellen wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. hergestellt (Inoue et al. 1990). Dazu wurden 400 ml SOB-Medium mit 100 µl einer DH5 $\alpha$ -Minikultur inokuliert und bei 18°C, 200 u/min bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 agitiert. Die Kultur wurde dann für 10 min auf Eis gestellt, die Bakterien für 10 min bei 3000 x g und 4°C abzentrifugiert, in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert, weitere 10 min auf Eis belassen, erneut zentrifugiert, in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert, dazu 0,5 ml DMSO zugegeben, nochmals 10 min auf Eis gestellt, aliquotiert und schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Transformation wurden 100 µl Aliquots 10 min auf Eis aufgetaut, 10 µl der DNA-haltigen Lösung zugegeben, das Gemisch 30 min auf Eis inkubiert, für 35 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und erneut für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurde 1 ml kaltes LB-Medium zugegeben, die Suspension für 1 h bei 37°C leicht geschüttelt und anschließend auf selektiven Platten ausgebracht. Für die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration in einer Lösung wurden Verdünnungsreihen der Transformation ausplattiert und Kolonien gezählt. Die Transformation eines Kontrollplasmids in bekannter Konzentration wurde in jedem Experiment als interner Standard mitgeführt, um die Transformationseffizienz zu überprüfen.

#### 5.3.3 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Die Elektroporationsmethode wurde zur Transformation von *E. coli* und Salmonellen angewendet. Dafür wurde der Biorad-Genepulser und die Biorad-Küvetten (0,2 µm) verwendet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 2 x 300 ml LB-Medium mit 3 ml einer ÜN-Kultur inokuliert und bei 37°C sowie 200 u/min bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 agitiert. Die Kulturen wurden dann für 10 min auf Eis gestellt, die Bakterien 10 min bei 3000 x g und 4°C abzentrifugiert, jeweils in 500 µl eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert, erneut zentrifugiert und 2x in 10%igem eiskaltem Glycerin gewaschen. Beide Pellets wurden zusammen in ca. 2 ml 10%igem Glycerin konzentriert und schließlich Aliquots zu je 50 µl auf Trockeneis eingefroren. Für die Transformation wurden diese Aliquots auf Eis für 10 min aufgetaut, 1-5 µl der DNA-haltigen Lösung zugegeben, für 5 min auf Eis inkubiert, in die eiskalte Küvette überführt,

gepulst, und im Anschluss wurde sofort 1 ml LB-Medium zugegeben. Der Puls erfolgte bei 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 200 Ohm für *E.coli* bzw. 400 Ohm für Salmonellen. Der Transformationsansatz wurde 1 h lang bei 37°C leicht geschüttelt und auf selektiven Platten ausgebracht.

#### 5.3.4 Arbeit mit Ff-Bakteriophagen

Der Helferphage M13KO7 wurde von der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen und entsprechend dem Herstellerprotokoll mit dem *E.coli*-Stamm JM109 propagiert. Die Verpackung eukaryontischer Expressionsvektoren als Phagenpartikel durch *E.coli* oder Salmonellen erfolgte durch Kotransformation der replikativen Form des Helferphagen-genoms mit der Phagemid-DNA. Da der Helferphage eine Kanamycin- und das Phagemid eine Ampicillin-Resistenz trägt, können koresistente Bakterien selektiert werden. Kulturen koresistenter Transformanten wurden in 2x YT-Medium bei 37°C und 200 u/min ÜN agitiert, Überstände durch zweimalige Zentrifugation für 10 min bei 5000 x *g* gewonnen und restliche Bakterien mit einem 0,45 $\mu$ m-Sterilfilter abgetrennt. Zur Bestimmung des Verhältnisses infektiöser Phagemid- und M13KO7-Partikel im Überstand wurde 1ml einer logarithmisch wachsenden phagenfreien JM109-Kultur (OD<sub>600</sub> ca. 0,8) mit 200  $\mu$ l des Überstandes infiziert und für 1 h bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen auf Ampicillin- und Kanamycin-Platten ausplattiert und die Kolonien nach 24 h gezählt. Die Einzelstrang-DNA der Phagenpartikel des Überstandes wurde mit dem Qiaprep-Spin-M13-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert. Für die liposomale Transfektion von Säugerzellen wurden Phagenpartikel aus den Überständen durch Fällung mit 5% Polyethylenglycol/0,8 M Ammoniumazetat aufkonzentriert und gereinigt. Dazu wurden 40 ml des Überstandes mit 10 ml einer 20% Polyethylenglycol/3,5 M Ammoniumazetat-Lösung versetzt, 1 h auf Eis gestellt, anschließend bei 9000 x *g* für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200  $\mu$ l sterilen PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Anzahl infektiöser Partikel sowie die Einzelstrang-DNA-Konzentration dieser Präparation bestimmt.

#### 5.3.5 Plasmidmobilisierung und Tn7-Transposition

Der *E.coli*-Stamm SM10 $\lambda$ pir trägt im Chromosom die Transferkomponenten des mobilen Plasmids RP4 (Simon et al. 1983) sowie den Prophagen  $\lambda$ pir (Miller und Mekalanos 1988). Das Tn7-Mini-Transposon des Plasmids pUX-BF5 ist für die stellenspezifische Integration fremder DNA in das Genom gramnegativer Bakterien geeignet (Bao et al. 1991). Dieses Carrierplasmid trägt die Mobilisierungsregion des Plasmids RP4 sowie zwischen den Transposonenden ein Kanamycin-Resistenzgen und die Insertionsstelle für fremde DNA. Das Helferplasmid pUX-BF13 trägt die für die Transposition benötigten Funktionen, ebenfalls die Mobilisierungsregion sowie den Replikationsursprung des Plasmids R6K. Da pUX-BF13 keinen anderen Replikationsursprung besitzt, kann das Plasmid nur in Gegenwart des *pir*-Genproduktes  $\pi$  replizieren, z.B. im Stamm SM10 $\lambda$ pir, jedoch nicht in dem gramnegativen Zielstamm. Die miniTn7-vermittelte Integration fremder DNA in Salmonellen wurde nach der Filterkonjugationsmethode von de Lorenzo et al. durchgeführt (de Lorenzo et al. 1990). Dazu wurden das Carrierplasmid und das Helferplasmid jeweils in den Stamm SM10 $\lambda$ pir transformiert

und über Nacht in LB-Medium bei 28°C und 200 u/min angezogen. Parallel wurde der Salmonellen-Stamm SL7207 unter gleichen Bedingungen angezogen. Von diesen Kulturen wurden jeweils 200 µl abgenommen, 3 min lang bei 3000 x g zentrifugiert, in 1,5 ml LB gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 20 µl LB resuspendiert. Die drei Aliquots wurden vereint und jeweils 15 µl dieses Gemisches auf ein 0,45µm-Zellulosefilter, aufliegend auf einer LB-Agar-Platte, pipettiert. Diese Platte wurde ca. 24 h bei 28°C im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Mobilisierung des Carrier- und des Helferplasmids in die Salmonellen. Anschließend wurde das Filter in LB-Medium resuspendiert und Strep/Kan-resistente Salmonellen auf entsprechenden LB-Platten selektiert. Von diesen Kolonien wurden Ampicillin-sensitive Klone identifiziert und die korrekte Integration in das bakterielle Chromosom mittels PCR überprüft (Abb. 5).

#### 5.3.6 Listeriolysin O-Hämolyseassay

Die Freisetzung von LLO durch Bakterien wachsender Schüttelkulturen wurde anhand der lytischen Aktivität des Kulturüberstandes gegenüber Schafserythrozyten bestimmt. Zunächst wurde zu 0,5 ml Schafsblut 1 ml PBS, pH 5,1 zugegeben, leicht gemischt und die Zellen bei 3000 x g für 5 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, und schließlich wurden die Zellen in 1 ml Lyse-PBS resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurden mit 3,9 ml Lyse-PBS verdünnt, davon 400 µl mit 400 µl Überstand der Bakterienkultur vermischt und dieses Gemisch 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert und die Absorption des durch die Erythrozytenlyse freigesetzten Hämoglobins im Überstand spektrophotometrisch bei 541 nm gemessen. Die vollständige Erythrozytenlyse, und damit der maximale Absorptionswert, wurde durch die Inkubation mit 1%igen Triton-X-100 in PBS erreicht. In Relation zu diesem Wert wurde die prozentuale Lyseeffizienz der anderen Proben errechnet.

#### 5.3.7 Keimzahlbestimmungen

Zur Quantifizierung der Salmonellen in einer Probe wurden die koloniebildenden Einheiten (cfu) durch serielle Plattierung einer Verdünnungsreihe dieser Probe in PBS bestimmt. Durch parallele Plattierung auf selektiven und nichtselektiven Medienböden wurde der prozentuale Anteil plasmidtragender Bakterien im Vergleich zur Gesamtkeimzahl ermittelt. Die Bakterienlast infizierter Säugerzellen wurde durch die Lyse der Zellen mit 0,25%igem Triton-X-100/PBS für 5 min bei 37°C und anschließender Plattierung des Lysats bestimmt. Gewebe von oral mit Salmonellen infizierten Mäusen wurde in 0,25%igem Triton-X-100/PBS auf Eis gestellt, zügig mit einem Homogenisator aufgeschlossen und seriell plattiert.

### 5.4 Zellbiologische Methoden

#### 5.4.1 Kultivierung und Langzeitaufbewahrung von Säugerzelllinien

Alle Säugerzellen wurden steril, in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre bei 5%igem CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Die Zelllinien COS-7, J774A.1, P815 und P815-S wurden in RPMI1640/10% iFKS/2 mM Glutamin gehalten. Das Medium wurde mit 100 U Penicillin sowie 100 µg/ml

Streptomycin supplementiert, sofern keine Infektion mit Salmonellen in den nächsten 24 h bevorstand. Die P815-S-Kultur wurde in ca. jeder vierten Passage mit 200 µg/ml Geneticin (GIBCO/BRL) supplementiert, um das HBsAg-Expressionsplasmid zu erhalten (Schirmbeck et al. 1994). Älteren Medien wurde jede zweite Woche frisches Glutamin zugefügt. Konfluente COS7-Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet, während die anderen Zellen mit einem Zellschaber abgelöst wurden. Bei der Trypsinierung einer T75-Flasche wurden die Zellen zuerst mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen und anschließend mit weiteren 2 ml für 2-5 min im Inkubator belassen. Abgelöste Zellen wurden in frischen Medium durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt, mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und für Experimente in entsprechender Zahl eingesät. Zur Langzeitaufbewahrung wurden Zellen geerntet, bei 800 x g für 1 min abzentrifugiert und in Medium gewaschen.  $2-5 \times 10^7$  Zellen wurden dann in 10 ml Einfriermedium zügig resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Suspension wurde auf 10 Cryoröhrchen verteilt, im -70°C-Gefrierschrank in einer Einmalküvettenstyroporbox langsam eingefroren und nach 24 h in den Flüssigstickstoffbehälter zur Langzeitaufbewahrung überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt, in 10 ml warmes Medium überführt, 2 x in Medium gewaschen und in eine Zellkulturflasche eingesät.

#### 5.4.2 Isolation primärer Peritonealmakrophagen der Maus

Peritonealmakrophagen der Maus wurden durch die i.p. Injektion von 200 µl 5%iger Saccharose-Saline angereichert. Zwei Tage nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Makrophagen mit 4-5 ml PBS aus dem Peritonealraum ausgewaschen. Die Zellen wurden bei 1500 x g für 5 min abzentrifugiert, in serumfreien RPMI1640-Medium resuspendiert und auf Deckgläschen einer 24well-Platte eingesät. Nach 3 h Inkubation wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch mehrfaches Waschen in PBS beseitigt und frisches RPMI1640-Medium supplementiert mit 5% iFKS zugegeben.

#### 5.4.3 Transfektion von Säugerzellen

Die Zellen wurden 24 h vor einer Transfektion ausgesät und das Medium nochmals 4 h vor dem Transfektionsbeginn gewechselt. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt ungefähr zu 60-80% konfluent. Das liposomale Transfektionsagens DAC30 der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) wurde zur Komplexierung von Plasmid-DNA und Phagenpartikeln verwendet. Für eine Vertiefung einer 6 well-Platte wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 6 µg DAC30 oder Phagenpartikel eines DNA-Gehaltes von 150ng mit 7,5 µg DAC30 komplexiert. Mögliche DNA- und RNA-Kontaminationen in der Phagenpräparation wurden kurz vor der Transfektion durch eine DNaseI/RNaseA-Behandlung beseitigt (Yokoyama-Kobayashi und Kato 1993). Zu 15 µl der Phagenpräparation wurden 2 µl 10x Nuklease-Puffer, 2 U DNaseI und 8 ng RNaseA zugegeben und das Gemisch für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Komplexbildung erfolgte in 125 µl serumfreien Optimum für 20 min bei RT. Inzwischen wurden die Zellen mit Optimum/5% FKS gewaschen und 1 ml in der Vertiefung für die Transfektion belassen. Die Komplexe wurde auf die Zellen geträufelt, für 4 h inkubiert und schließlich das Transfektionsmedium gegen



RPMI1640/10% FKS/Pen/Strep ausgetauscht. Die Volumina für Transfektionen in einer 24well-Platte oder einer 10cm-Schale wurden entsprechend angepasst.

#### 5.4.4 Infektion von Säugerzellen mit Salmonellen

Ein Tag vor der Infektion wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung einer 24well-Platte in Antibiotika-freiem Medium auf Deckgläschen eingesät. Die Salmonellen wurden als stehende ÜN-LB-Kultur, supplementiert mit Antibiotika und 1,5% (g/v) NaCl, bei 37°C angezogen, zweimal in PBS gewaschen, und entsprechend der OD<sub>600</sub> wurde die Bakteriendosis in 100 µl Medium/5% iFKS eingestellt. Die Zellen wurden 1 h vor der Infektion mit Medium/5% iFKS gewaschen, je Vertiefung wurden 200 µl belassen, die Bakterien zugegeben und die Platte bei 800 x g für 1 min zentrifugiert. Die Infektionsdosis war für COS7-Zellen in der Regel MOI 100 (*multiplicity of infection*), d.h. in der Vertiefung befanden sich während der Infektion 100 Bakterien je Zelle. Für J774A.1-Zellen sowie primäre Peritonealmakrophagen betrug die MOI 10. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen und verbliebene extrazelluläre Bakterien durch eine 90-minütige Inkubation in Medium/5% iFKS, supplementiert mit 100 µg/ml Gentamicin, abgetötet. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und Medium/10% iFKS/10 µg/ml Gentamicin zugegeben. Die intrazelluläre Proliferation der Salmonellen wurde durch Zugabe von 100 U Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin in das Medium gestoppt.

#### 5.4.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde zur spezifischen Detektion von Salmonellen, Phagenpartikeln sowie der Expression von HBsAg in infizierten bzw. transfizierten Zellen angewendet. Die Zellen wurden auf Deckgläschen in einer 24well-Platte kultiviert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 3%iger Paraformaldehyd-Lösung über Nacht bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in PBS-P für 30 min permeabilisiert und geblockt. Der erste Antikörper (oder ein Antikörpergemisch für eine Doppelfärbung) wurde in PBS-P in der Regel 1:100 verdünnt, auf die Deckgläschen gegeben und 1 h lang mit den Zellen in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde nochmals für 5 min mit PBS-P geblockt, dann der Fluorophor-gekoppelte Zweitantikörper, ebenfalls 1:100 in PBS-P verdünnt, auf die Deckgläschen gegeben und die Zellen erneut für 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Die Einbettung der Deckgläschen in Mowiol erfolgte nach dreimaligen Waschen in PBS und einem Waschschriff in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> Die Objektträger wurden dann für 1 h bei RT getrocknet und anschließend im Dunkeln aufbewahrt. Die Präparate wurden entweder mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert oder mit dem Konfokal-Mikroskop (Leika TCS NT-System) im Durchlicht und bei den Wellenlängen 488nm oder 568 nm, entsprechend der gewählten Färbung, betrachtet. Licht, emittiert durch das in lebenden Zellen exprimierte grüne fluoreszierende Protein der Qualle *Aequorea victoria*, wurde ebenfalls bei einer Wellenlänge von 488 nm detektiert.

#### 5.4.6 Nachweis von HBsAg in einer Probe

Die HBsAg-Expression in Zellen wurde mit dem HBsAg-Sandwich-ELISA der Firma Biokit (Barcelona, Spanien) nachgewiesen. Konfluente infizierte oder transfizierte Zellen einer 35mm-Schale wurden zweimal mit PBS gewaschen, 0,5 ml Proteaseinhibitor-Lösung wurde zugegeben, die Zellen abgeschabt und durch einen dreimaligen Schockfrier-/Tauzyklus auf Trockeneis und im lauwarmen Wasserbad aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden kurz abzentrifugiert und das Lysat für den Sandwich-ELISA entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Bakterielle Lysate von ÜN-Kulturen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und ebenfalls im ELISA getestet. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe des gereinigten HBsAg-Proteins der Firma Biofa (Vilnius, Litauen) verwendet.

#### 5.4.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden Salmonellen-infizierte Zellen 8 h nach Infektionsbeginn in PBS gewaschen und mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS ÜN bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen von der Schale abgeschabt, in 3% „low-melting“ Agarose geliert, mit 1% Osmiumtetroxid, 0,1% Gerbsäure sowie 2% Uranylazetat nachfixiert. Die Probe wurde anschließend in einer Ethanolreihe dehydriert und in AGAR 100 eingebettet. Sektionen mit einer Dicke von 70 nm wurden mit Bleizitrat kontrastiert und mit dem Zeiss-Elektronenmikroskop EM-10 (Oberkochen, Germany) analysiert.

### 5.5 Immunologische Methoden

#### 5.5.1 Intramuskuläre DNA-Vakzinierung

Zur Minimierung von LPS-Kontaminationen wurde das HBsAg-Expressionsplasmid pCMV-S mit dem Endofree-Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) aufgereinigt und in einer Konzentration von 1 µg/µl DNA mit endotoxinfreiem PBS von GIBCO/BRL (Paisley, Schottland) eingestellt. Die Narkotisierung der Balb/c Mäuse erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 200 µl des Ketamin/Xylazin-Narkotikums. Nach dem Eintreten der Wirkung wurden beidseitig die Schenkel rasiert und jeweils 50 µl der DNA-Lösung in den *Musculus tibialis anterior* injiziert. Dazu wurde eine Feindosierungsspritze mit fester Nadel verwendet, über die ein Polyethylenschlauch gestülpt war, so dass ca. 1 mm der Nadelspitze hervorstach. Aufgrund der Elastizität des Schlauches gelangte die Nadelspitze ca. 3 mm während der Injektion in den Muskel, die DNA-Lösung wurde langsam injiziert und die Nadel noch ca. 10 s in der Einstichstelle gehalten. Anschließend wurden die Tiere zurück in den Käfig gesetzt und während des Aufwachens beobachtet.

#### 5.5.2 Orale Immunisierung mit Salmonellen

Vor der Immunisierung wurde die kommensale Flora des Darms reduziert, um die Invasion der Darmschleimhaut durch die Salmonellen zu erleichtern (Bohnhoff et al. 1964). Zehn Stunden vor der Immunisierung wurden 50 mg Streptomycin gelöst in 400 µl keimfreiem Trinkwasser den Tieren oral mit einer Magensonde verabreicht und die Tiere anschließend nüchtern gesetzt. Die Salmonellen wurden folgendermaßen angezogen: von einer 4ml-LB-Vorkultur wurde eine

100ml-Übernachtskultur angeimpft und bei 50 u/min sowie 37°C unter anaeroben Bedingungen agitiert. Dem LB-Medium wurden die entsprechenden Antibiotika zugesetzt und die NaCl-Konzentration auf 2,5% (g/v) erhöht. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000 x g geerntet, in PBS gewaschen und schließlich in PBS/5% Natriumbicarbonat auf eine Konzentration von  $2 \times 10^9$  cfu/ml eingestellt. Den Mäusen wurden 100 µl dieser Suspension intragastrisch verabreicht, und anschließend wurde ihnen das Futter zurückgegeben.

#### 5.5.3 Analyse der Serumantikörperantwort

Zur Analyse der HBsAg- und Salmonellen-spezifischen Serumantikörperantwort wurde den Tieren unter Ethernarkose Blut aus dem retroorbitalen Plexus mit heparinierten Kapillaren entnommen. Das Blut wurde zur Gerinnung ÜN bei 4°C belassen und anschließend das Serum von den Blutzellen mit der Tischzentrifuge bei 10000 x g für 10 min abgetrennt. Die Analyse der spezifischen Antikörperantwort wurde mittels ELISA durchgeführt. Dazu wurden 96well-Platten (Maxisorb, Nunc) entweder mit 0,5 µg/Vertiefung HBsAg-Protein in PBS oder mit 2,5 µg Salmonellen-Lysat in PBS in einem Volumen von 50 µl/Vertiefung ÜN bei 4°C beschichtet. Das Salmonellen-Lysat wurde zuvor durch Ultraschallbehandlung in PBS gewaschener Salmonellen des Stammes SL3261 hergestellt und die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode bestimmt. Die Platten wurden anschließend dreimal in PBS/0,05% Tween20 gewaschen, je Vertiefung 80 µl der Blockierungslösung PBS/2% BSA zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Drei Waschschriffe in dem PBS/0,05%Tween20-Bad folgten. Die Seren einzelner Tiere wurden in PBS/2% BSA verdünnt und jeweils 50 µl jeder Verdünnung in zwei oder drei Vertiefungen der Platte gefüllt. Zum Abgleich der Werte mehrerer Platten wurde auf jeder Platte ein positives Standardserum für HBsAg sowie für Salmonellen mitgeführt. Die Serumverdünnungen verblieben für 2 h bei 37°C auf der Platte, wieder gefolgt von drei Waschungen. Als Zweitantikörper wurden 50 µl des Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG-Biotin-Konjugats von Sigma (München, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:8000 mit PBS/1% BSA je Vertiefung pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Über die Bindung an Biotin erfolgte die Kopplung der alkalischen Phosphatase (AP) an die antigenspezifisch gebundenen Antikörperkomplexe. Dafür wurde ExtrAvidin-AP von Sigma in einer Verdünnung von 1:6000 eingesetzt und für 1 h bei 37°C auf der Platte belassen. Die Platten wurden nochmals drei Waschungen in PBS/0,05%Tween20 unterzogen, zweimal mit AP-Substratpuffer gewaschen, und schließlich wurden je Vertiefung 50 µl des AP-Substrates zugegeben. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und jeweils nach 30 min, 2 h und 12 h spektrophotometrisch bei 405 nm vermessen.

#### 5.5.4 Analyse zytotoxischer T-Lymphozyten

HBsAg-spezifische CTL wurden mit einem klassischen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay detektiert. Zwei Wochen nach der letzten oralen Immunisierung wurde je zwei Tieren einer Gruppe aseptisch die Milz entnommen. Jeweils zwei Organe wurden in 6 ml eiskaltem HBSS/2% iFKS mit einem Spritzenstößel in einer Petrischale zerkleinert und die Zellen mit einem feinen Nylonsieb von Geweberesten getrennt. Nach der Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min wurde die Zellen in 2,5 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einem

Waschschritt in 10 ml HBSS/2% iFKS wurden die Zellen schließlich in 3 ml Komplettmedium resuspendiert. Auf gleiche Weise wurden Milzzellen naiver Tiere gewonnen, mit einer Energiedosis von 30 Gray bestrahlt, zweimal in Medium gewaschen und in 20 ml Medium resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde das HBsAg<sub>28-39</sub>-Peptid in einer Konzentration von 10 µM gegeben und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen als Stimulatorzellen in einer gemischten Lymphozytenkultur zusammen mit den Milzzellen immunisierter Tiere verwendet. Diese Kokulturen enthielten  $4 \times 10^7$  Milzzellen und  $3 \times 10^7$  Stimulatorzellen, angesetzt in einer aufrecht stehenden T25-Flasche in 10 ml Komplettmedium und supplementiert mit 20 µg/ml Gentamicin. Die Kulturen wurden für 5 Tage inkubiert, dann wurde ihnen 30 U/ml murines IL2 zugesetzt und einen weiteren Tag bei 37°C inkubiert. Die *in vitro* restimulierten Milzzellen wurden anschließend gewaschen, gezählt und in den Verhältnissen 100:1, 30:1, 10:1 und 3:1 mit radioaktiv gepulsten Zielzellen P815-S oder P815 auf 96well-Platten vermischt. Gepulst wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml Medium mit 100 µCi Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> für 2 h bei 37°C. Die Platten wurden 4 h lang bei 37°C inkubiert, und anschließend wurden die Überstände zwecks Aktivitätsbestimmung mit dem Top-Count-Gerät auf eine Luminaplatte transferiert. Die maximale <sup>51</sup>Cr-Freisetzung wurde durch Zugabe von 2,5% Triton-X-100 zu der konstanten Zahl an Zielzellen bestimmt und der Minimalwert aus den Überständen ohne Effektorzellen kultivierter Zielzellen ermittelt. Die Berechnung der spezifischen prozentualen <sup>51</sup>Cr-Freisetzung erfolgte nach folgender Gleichung :

$$\%^{51}\text{Cr} = (\text{cpm}_{\text{exp}} - \text{cpm}_{\text{min}}) / (\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{min}}).$$

#### 5.5.5 Analyse der mukosalen Antikörperantwort

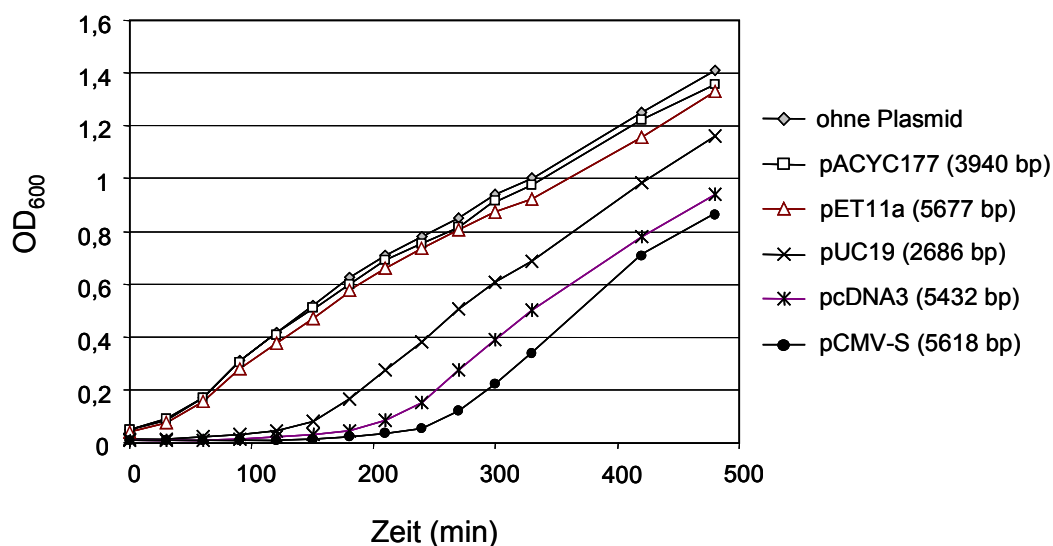
Parallel zur Entnahme der Milz für den CTL-Assay wurden die Dünndarmsekrete gewonnen. Dazu wurde der Darm hinter dem Magenausgang und vor dem Blinddarm durchtrennt und mit 2 ml EDTA-Trypsininhibitor-Lösung durchspült. Dem Durchfluss wurde 1 ml PBS zugegeben, das Ganze gut vermischt, bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert, 2 ml des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 30 µl der PMSF-Lösung zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 10000 x g und 4°C, wurden zu dem Überstand nochmals 30 µl PMSF, 30 µl 2%iger Natriumazidlösung sowie 150 µl 7%iger BSA-Lösung gegeben. Die Analyse HBsAg- bzw. Salmonellen-spezifischer sekretorischer Antikörper erfolgte ähnlich dem Protokoll 3.5.3. Die Sekrete wurden in PBS/2% BSA 1:1 verdünnt und davon je Vertiefung 50 µl in beschichtete und geblockte 96well-ELISA-Platten pipettiert. Als Zweitantikörper wurde das Ziege-α-Maus-IgA-Peroxidase-Konjugat von Sigma (München, Deutschland), 1:4000 in PBS/1% BSA verdünnt, eingesetzt. Nach dem Waschen der Platten wurde je Vertiefung 50 µl des Peroxidasesubstrats gegeben, die Platten 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl/Vertiefung 10 N Schwefelsäure abgebrochen. Die Platten wurden anschließend bei 490 nm spektrophotometrisch vermessen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Plasmidtragende Salmonellen

#### 6.1.1 Wachstum und Plasmidstabilität in der Kultur

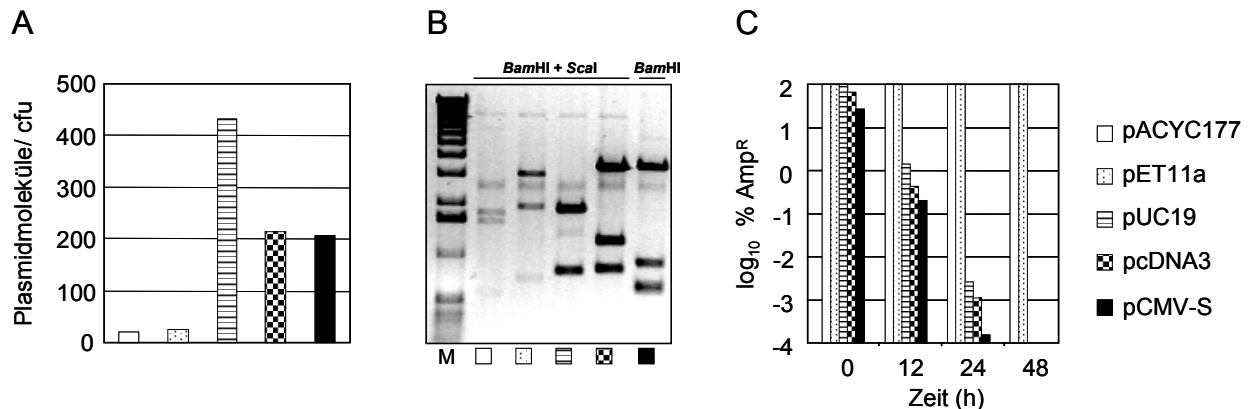
Der effektive Transfer von Plasmid-DNA aus Salmonellen in den Zellkern infizierter Wirtszellen setzt die Erhaltung des eukaryontischen Expressionsplasmids in möglichst hoher Kopienzahl bis zum Zeitpunkt der bakteriellen Desintegration voraus. Der *aroA*-attenuierte *S. enterica* Typhimurium-Stamm SL3261 wurde mit Plasmiden unterschiedlichen Replikationsursprungs transformiert und zunächst das Wachstum unter selektivem Druck durch Antibiotika in der Kultur verfolgt. Das Wachstum der Transformanten mit den Niedrigkopienzahlplasmiden pACYC177 und pET11a glich dem des plasmidlosen Stammes. Dagegen verlangsamte sich das Wachstum der mit dem Hochkopienzahlplasmid pUC19 und den pUC19-abgeleiteten Vektoren pcDNA3 sowie pCMV-S transformierten Bakterien (Abb. 8). Das Plasmid pcDNA3 trägt die leere eukaryontische Expressionskassette, während das Plasmid pCMV-S die Expressionskassette für das in dieser Arbeit als Modellantigen verwendete kleine Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) enthält (Davis et al. 1993).



**Abb. 8: Einfluss der Erhaltung von Plasmiden unterschiedlichen Replikationsursprungs und Komplexität auf das Wachstum des Stammes SL3261.** Ampicillin-supplementiertes Medium wurde jeweils mit gleichem Volumen einer stationären Vorkultur inokuliert und das Wachstum anhand der OD<sub>600</sub> verfolgt.

In der späten logarithmischen Phase wurde Plasmid-DNA aus den Kulturen isoliert und die Anzahl der Plasmidmoleküle je Bakterium anhand der DNA-Konzentration sowie der jeweiligen Plasmidgröße bestimmt. Die Molekülanzahl der Hochkopienzahlplasmide je Bakterium übersteigt die der Niedrigkopienzahlplasmide um mehr als eine Größenordnung (Abb. 9A). Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Molekülzahlen wurde die isolierte Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 9B). Die Erhaltung der Plasmide ohne selektiven Druck durch Ampicillin wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt. Während die Niedrigkopienzahlplasmide in diesem Zeitraum zuverlässig erhalten

werden, gehen die pUC19-abgeleiteten Plasmide innerhalb von zwölf Stunden fast vollständig verloren (Abb. 9C). Die Erhaltung der Hochkopienzahlplasmide stellt eine hohe Stoffwechsellast für die Salmonellen dar. Bereits im Ampicillin-supplementierten Medium enthalten nicht alle Bakterien der Kultur den pUC-abgeleiteten Vektor.

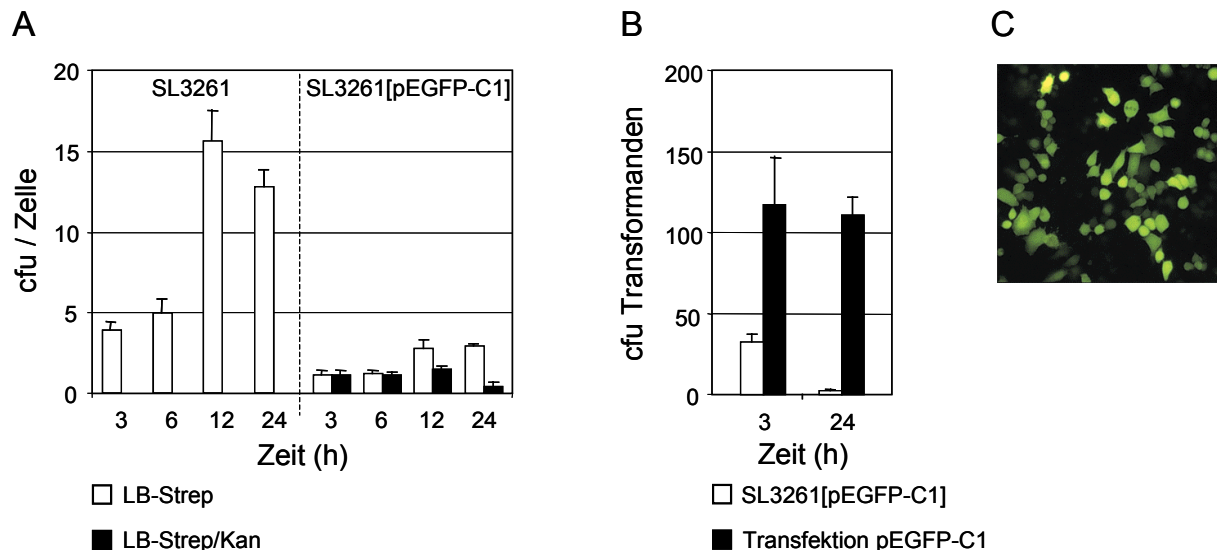


**Abb. 9: Kopienzahl und Stabilität von Plasmiden unterschiedlichen Replikationsursprungs und Komplexität in den Bakterien des Stammes SL3261.** A) Aus Ampicillin-supplementierten Kulturen wurde bei der OD<sub>600</sub> 0,7 Plasmid-DNA gewonnen und anhand der DNA-Konzentration sowie der jeweiligen Plasmidgröße die Plasmidmolekülzahl je Bakterium berechnet. B) Plasmid-DNA aus 200 µl Kultur wurde mit den Restriktionsenzymen verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (M = Größenmarker). C) Der prozentuale Anteil plasmidtragender Bakterien (% Amp<sup>R</sup>) wurde durch Plattierung nicht-selektiv gezogener Kulturen auf LB-Platten mit und ohne Ampicillin bestimmt.

#### 6.1.2 Infektion und Transfektion von Säugerzellen

*In vitro* kultivierte Säugerzellen sind für die Evaluierung von eukaryontischen DNA-Vektorsystemen geeignet. Die Effizienz des DNA-Transfers lässt sich in lebenden Zellen leicht anhand der Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* bestimmen. Das eukaryontische Expressionsplasmid pEGFP-C1 trägt eine für die Expression in Primatenzellen optimierte Variante des GFP-Gens und wurde als Reporterplasmid zur Evaluierung des Salmonellen-vermittelten Gentransfers verwendet. Dieses Plasmid ist ebenfalls ein pUC-abgeleitetes Hochkopienzahlplasmid, trägt jedoch ein Kanamycin-Resistenzgen. Im Gegensatz zu Ampicillin gewährleistet die Selektion mit Kanamycin, dass alle Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion das Plasmid enthalten. Zunächst wurde der Infektionsverlauf der Stämme SL3261 sowie SL3261[pEGFP-C1] in der Nierenepithelzelllinie COS7 analysiert. COS7-Zellen tolerieren die hochdosierte Infektion mit SL3261 (MOI 100) sowie die ungebremste intrazelluläre Proliferation der Bakterien bis zu ca. zwölf Stunden. Zu diesem Zeitpunkt wird eine Last von durchschnittlich 10-20 Bakterien je Zelle erreicht (Abb. 10A). Die Zugabe von Penicillin/Streptomycin in das Medium zwölf Stunden nach der Infektion stoppt das intrazelluläre Wachstum der Bakterien, so dass die Wirtszellen einen Zeitraum von weiteren 2-3 Tagen überleben. Plasmidtragende Salmonellen infizieren COS7-Zellen weniger effizient als der plasmidlose Stamm, wahrscheinlich aufgrund der zusätzlichen Stoffwechsellast durch die Plasmidreplikation. Die Plasmiderhaltung in den intrazellulären Salmonellen, und somit das

Potential für einen möglichen DNA-Transfer im Verlauf der Infektion, wurde durch die Plattierung aus dem Zellysat gewonnener Bakterien auf selektiven und nicht-selektiven Platten bestimmt (Abb. 10A). Während der ersten Stunden der Infektion trägt eine große Fraktion der Bakterien das eukaryontische Expressionsplasmid. Ein Tag nach Infektionsbeginn ist das Plasmid jedoch nur noch in wenigen Bakterien erhalten. Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere Methode bestätigt. Salmonellen-infizierte oder liposomal transfizierte COS7-Zellen wurden nach 3 bzw. 24 Stunden geerntet und Plasmid-DNA mit dem Qiagen-Miniprep-Kit aus dem Zellysat extrahiert. Die DNA wurde zur Quantifizierung in kompetente *E.coli* transformiert und die Kolonienzahl als relatives Maß für den Gehalt der Plasmid-DNA im Zellysat verwendet (Abb. 10B). Ein Tag nach dem Infektionsbeginn konnte aus den Salmonellen-infizierten Zellen nur sehr wenig Plasmid-DNA isoliert werden, während die DNA-Menge in den transfizierten Zellen annähernd konstant blieb. Zu diesem Zeitpunkt wurde in den infizierten Zellen keine GFP-Expression detektiert, jedoch waren ca. 30% der transfizierten Zellen GFP-positiv (Abb. 10C). In den Zellkulturexperimenten wurden ebenfalls die attenuierten *S.enterica* Typhimurium-Stämme SL7207 sowie  $\chi$ 4072 auf ihre DNA-Transferkapazität getestet. Der Stamm SL7207 wurde auf gleiche Weise wie SL3261 erzeugt (Hoiseth und Stocker 1981), ist jedoch geringfügig virulenter in der Maus als SL3261 und wurde als DNA-Vektor bereits verwendet (Darji et al. 1997). Der Stamm  $\chi$ 4072 trägt eine Deletion des *asd*-Gens, neben den attenuierenden Mutationen in den Genen der Adenylatzyklase (*cya*) sowie dem cAMP-Rezeptor (*crp*) (Nakayama et al. 1988). Dieser Stamm ist aufgrund der Deletion des *asd*-Genlokus auxotroph für Diaminopimelische Säure, eines für die Zellwandsynthese notwendigen Substrats. Da dieses Substrat in eukaryontischen Zellen nicht verfügbar ist, führt die *asd*-Mutation in der infizierten Wirtszelle zum schnellen Absterben der Bakterien. Auch diese Stämme, transformiert mit dem Plasmid pEGFP-C1, konnten keine GFP-Transgenexpression in COS7-Zellen induzieren. Die plasmidstabilisierende Komplementierung der chromosomalen *asd*-Deletion durch eine plasmidkodierte *asd*-Kassette (pHL136a), eine etablierte Strategie zur Stabilisierung von Antigenexpressionsvektoren (Galan et al. 1990), zeigte ebenfalls keinen Effekt hinsichtlich der Induktion einer Transgenexpression in infizierten COS7-Zellen. Diese Experimente wurden auf die Makrophagenzelllinie J774.A und frisch isolierte Peritonealmakrophagen der Maus ausgedehnt. Eine Reihe verschiedener Infektionsprotokolle wurde mit diesen verschiedenen Salmonellen-Stämmen und Säugerzellen getestet, um die intrazelluläre Freisetzung von Plasmid-DNA auszulösen. So wurde der zeitliche Ablauf der Infektion variiert oder zellgängige Antibiotika, wie Tetrazyklin, Penicillin, Streptomycin und G418 in unterschiedlichen Konzentrationen in das Medium gegeben. Potentiell kann das zellgängige Antibiotikum G418 zur Erhaltung des Plasmids pEGFP-C1 in den intrazellulären Bakterien beitragen, da der Vektor die Kanamycin-Resistenzgen trägt. Jedoch führte keines der getesteten Protokolle zu einer GFP-Transgenexpression nach 24 oder 48 Stunden. Nur vereinzelt konnten fluoreszierende Zellen detektiert werden, jedoch unterschieden sie sich meist zu benachbarten Zellen in der Morphologie. Diese Versuche zeigen, dass trotz der Einschleusung von Plasmid-DNA in Säugerzellen durch Salmonellen letztendlich diese DNA nicht in den Nukleus der Wirtszelle unter den *in vitro*-Bedingungen transferiert wird.



**Abb. 10: Infektion und Transfektion von COS7-Zellen.** A) COS7-Zellen wurden mit den Stämmen SL3261 und SL3261[pEGFP-C1] mit MOI 100 infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert und freigesetzte Bakterien auf nicht-selektiven versus Kanamycin-haltigen Medienplatten quantifiziert. 12 h nach Infektionsbeginn wurde dem Medium jeweils 1 x Penicillin/Streptomycin zugesetzt. B) COS7-Zellen ( $10^6$  Zellen) wurden entweder mit SL3261[pEGFP-C1] infiziert (MOI 100) oder mit 5  $\mu$ g pEGFP-C1 liposomal transfiziert. Aus jeweils  $10^4$  COS7-Zellen wurde Plasmid-DNA reisoliert und in kompetente *E.coli* transformiert. C) GFP-positive Zellen 24 h nach der DNA-Transfektion.

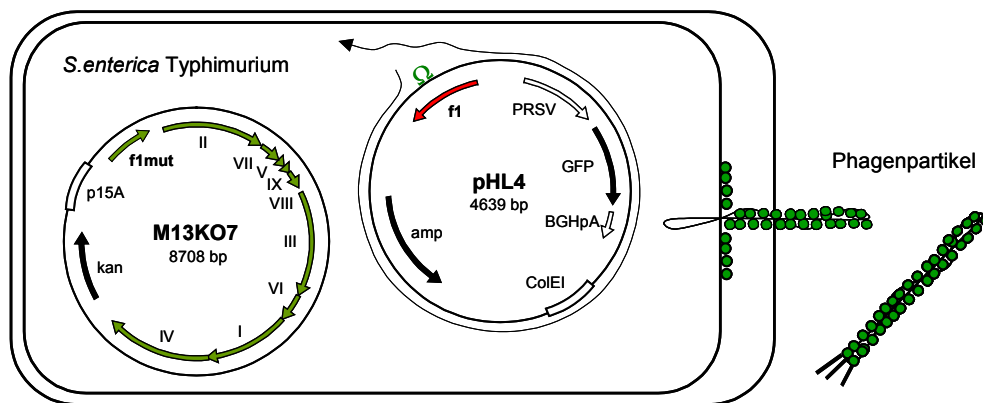
## 6.2 Sekretion von Plasmiden aus Salmonellen

### 6.2.1 Sekretion filamentöser Phagenpartikel in der Kultur

Einzelstrang-DNA-Bakteriophagen der Familie Microviridae gehören zu den kleinsten Viren überhaupt. Während sphärische Phagen dieser Familie, z.B.  $\phi$ X174, nach dem Abschluss des Replikationszyklus die Wirtszellen zerstören, führt die Vermehrung der untereinander sehr eng verwandten Ff-Phagen, M13, f1 und fd, nicht zur Zellyse. Die Bezeichnung Ff-Phage weist auf den für die Infektion notwendigen F-Pilus von *E.coli* und auf die filamentöse Form des Phagenpartikels hin. Sofort nach der Infektion wird die zirkuläre virale Einzelstrang-DNA durch Wirtszellenzyme in eine doppelsträngige replikative Form (RF) umgewandelt. Ausgehend von diesem RF-Molekül erfolgt die Replikation nach dem sogenannten „rolling circle“-Mechanismus, vermittelt durch einen nichtkodierenden Bereich des viralen Genoms. Neben dem Replikationsursprung enthält diese sogenannte intergene Region (IR) das Verpackungssignal. Die kontinuierliche Replikation des zirkulären Phagengenoms und dessen Verpackung als filamentöse Partikel in einer logarithmisch wachsenden *E.coli*-Kultur stellt eine äußerst effektive Form bakterieller DNA-Sekretion dar. Überträgt man die IR-Region auf ein Plasmid, so wird diese als Phagemid bezeichnete Hybride in Anwesenheit eines Helferphagen mit einem abgeschwächten Replikationsursprung, z.B. M13KO7, von der *E.coli*-Wirtszelle präferentiell vermehrt und als Phagenpartikel verpackt (Vieira und Messing 1987). Eukaryontische Expressionsplasmide unterschiedlicher Größe können auf diese Weise in hoher Kopienzahl aus der bakteriellen Zelle ausgeschleust, aus dem Medium gewonnen und für die Transfektion von

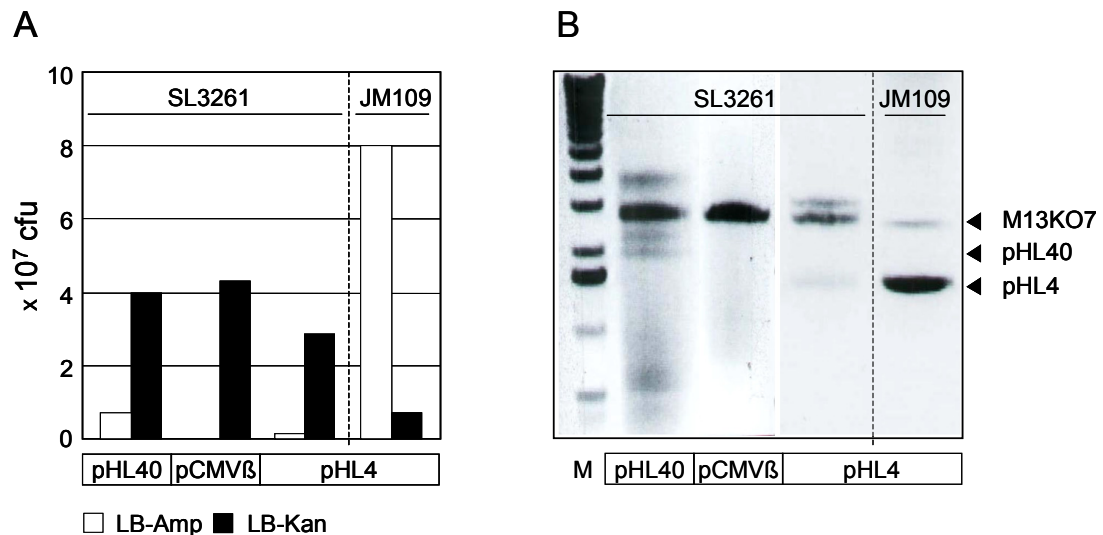


Säugerzellen unterschiedlicher Herkunft verwendet werden (Yokoyama-Kobayashi und Kato 1994). Hier wurde untersucht, ob Plasmid-DNA als Phagenpartikel aus Salmonellen in der infizierten Wirtszelle sezerniert werden kann und diese Partikel dann den DNA-Transfer in den Wirtszellkern vermitteln können. Der Impfstamm SL3261 lässt sich nicht mit dem Helferphagen M13KO7 infizieren, da den Bakterien der dazu erforderliche F-Pilus fehlt. Deshalb wurden das eukaryontische GFP-Expressionsplasmid pHL4 sowie die  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsplasmide pHL40 bzw. pCMV $\beta$  jeweils zusammen mit der doppelsträngigen RF-Form des Helferphagen M13KO7 in den Salmonellen-Stamm SL3261 sowie den *E.coli*-Stamm JM109 transformiert und koresistente Bakterien mit Ampicillin und Kanamycin selektiert (Abb. 11).



**Abb. 11: Prinzip der Sekretion eines eukaryontischen Reporterphagemids als Phagenpartikel aus Salmonellen.** Der Helferphage M13KO7 vermittelt die Synthese des zirkulären DNA-Einzelstranges des Reporterphagemids, dessen Verpackung und Sezernierung aus der bakteriellen Zelle.  $\Omega$  markiert den Replikationsstartpunkt in der wt-IR-Region des Phagemids pHL4, f1mut bezeichnet die mutierte IR-Region des Helferphagen M13KO7. Die Ff-Phagen-abgeleiteten Komponenten sind in Rot dargestellt.

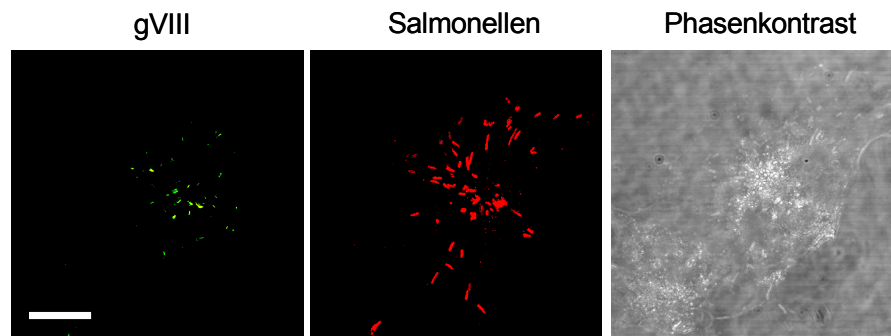
Die Phagensekretion dieser Bakterien wurde analysiert. Überstände logarithmisch wachsender Kulturen wurden zur Infektion einer phagenfreien *E.coli*-Kultur des F<sup>+</sup>-Stammes JM109 eingesetzt, und Verdünnungsreihen wurden auf Ampicillin- sowie Kanamycin-Platten ausgebracht. Die Zahl der Kolonien auf den jeweiligen Selektivplatten widerspiegelt das Verhältnis infektiöser Phagemid- und Helferphagenpartikel in den jeweiligen Überständen (Abb. 12A). Desweiteren wurden Phagenpartikel aus dem zellfreien Medium stationärer Kulturen gefällt, die zirkuläre Einzelstrang-DNA der Partikel extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 12B). Während in der kotransformierten *E.coli*-Kultur präferentiell das Phagemid pHL4 sekretiert wird, überwiegt in den Salmonellen-Kulturen die Verpackung des Helferphagen. Das Plasmid pCMV $\beta$ , Ausgangsplasmid für die Klonierung von pHL40, trägt keine IR-Region und wird nicht verpackt. Präparierte Phagenpartikel wurden für die liposomale Transfektion von COS7-Zellen eingesetzt. Nur die aus dem Überstand der koresistenten *E.coli*-Kultur gewonnenen Phagen vermitteln in COS7-Zellen die GFP-Reporterexpression. Im Gegensatz dazu wurde keine GFP-Expression mit Phagenpartikeln aus der Kultur des Stammes SL3261[pHL4/M13KO7] induziert, wahrscheinlich aufgrund der geringen Phagenzahl mit der GFP-Expressionskassette.



**Abb. 12: Quantifizierung sekretierter Phagenpartikel in den Kulturüberstand.** Der Salmonellen-Stamm SL3261 und der *E.coli*-Stamm JM109 wurden mit der RF-DNA des Helferphagen M13KO7 sowie den jeweiligen Plasmiden kotransformiert. A) Infektiöse Phagenpartikel der Kulturüberstände wurden durch Reinfektion einer *E.coli*-Kultur und anschließender Plattierung auf selektiven Medienböden quantifiziert. Die Überstände wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 abgenommen und sterilfiltriert. B) Aus Phagen isolierte Einzelstrang-DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Je Spur wurde die Einzelstrang-DNA aus 4 ml Kulturüberstand einer frühen stationären Kultur (OD<sub>600</sub> = 1,2) aufgetragen. Schwarze Pfeile weisen auf die Position der zirkulären Einzelstrang-DNA-Moleküle, M = DNA-Marker.

### 6.2.2 Freisetzung von Phagenpartikeln in der Wirtszelle

Die mögliche Freisetzung von Phagenpartikeln aus Salmonellen in der infizierten Wirtszelle wurde mit der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden COS7-Zellen mit dem Stamm SL3261[M13KO7] infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Die Präparate wurden mit einem Protein gVIII- und einem Salmonellen-spezifischen Antikörper doppelgefärbt und mikroskopisch analysiert. In einem Zeitraum von 24 Stunden konnte keine Akkumulation von Phagenpartikel in infizierten Zellen beobachtet werden. Phagenpartikel werden schon drei Stunden nach der Infektion detektiert und die Signalstärke blieb über einen Zeitraum von 24 Stunden vergleichbar (Abb. 13). Trotz wiederholter Waschschriffe in PBS sind wahrscheinlich einige Phagen mit Salmonellen noch äußerlich assoziiert und gelangen bei der Infektion gemeinsam mit den Bakterien in die Wirtszelle. Der Helferphage M13KO7 wurde nach 12 Stunden noch in 65% und nach 24 Stunden noch in 30% reisolierter Salmonellen nachgewiesen. Die Infektion von COS7-Zellen mit dem Stamm SL3261[pHL4/M13KO7] führte nach 24 oder 48 Stunden zu keiner GFP-Transgenexpression. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Sekretion von Plasmid-DNA als Phagenpartikel aus Salmonellen nicht oder nur in sehr begrenztem Umfang in der infizierten Wirtszelle stattfindet und kein nachweisbarer DNA-Transfer vermittelt wird.

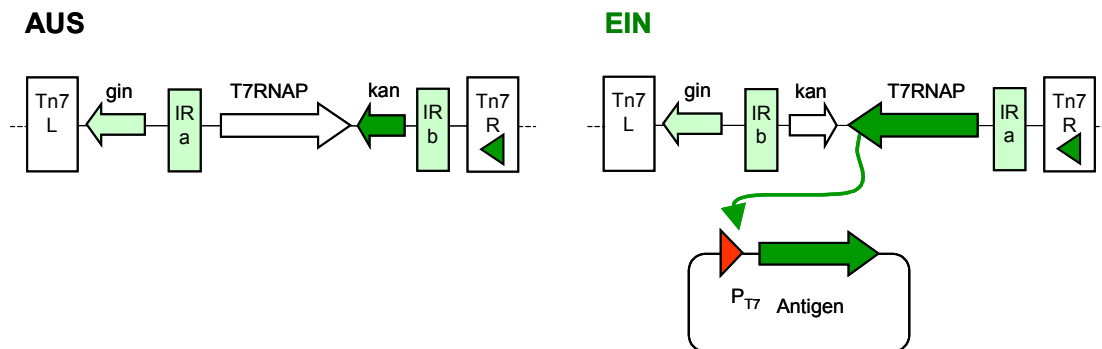


**Abb. 13: Infektion von COS7-Zellen mit Phagen-sezernierenden Salmonellen.** COS7-Zellen wurden mit dem Stamm SL3261[M13KO7] infiziert (MOI 100) und nach 24 Stunden gefärbt. Für die Doppelimmunfärbung wurde der für das virale Haupthüllprotein gVIII spezifische Antikörper B62-FE2 (Micheel et al. 1994) sowie das polyspezifische Testreagenz Anti-Salmonella-I verwendet (weißer Balken = 40  $\mu\text{m}$ ).

### 6.3 Freisetzung von Plasmid-DNA und Proteinen durch autolytische Salmonellen

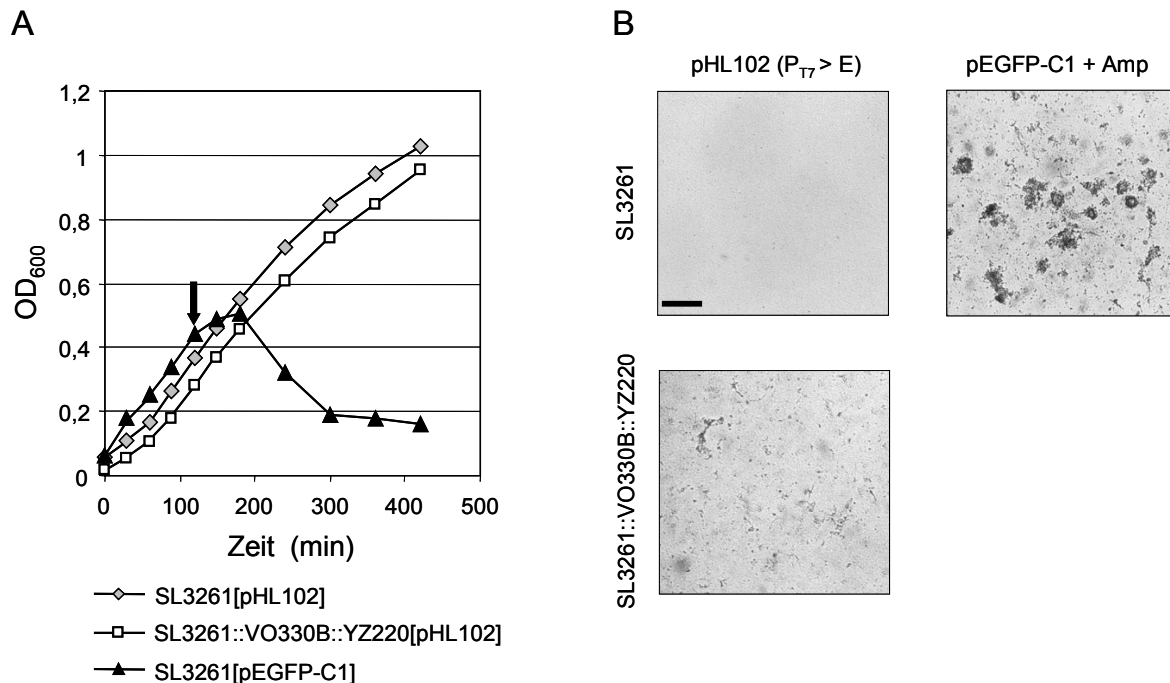
#### 6.3.1 Phasenvariation zur Induktion bakterieller Autolyse

Die Konstruktion eines bakteriellen Suizidsystems ist ein alternativer Ansatz, um Plasmid-DNA aus Salmonellen in das Zytoplasma infizierter Wirtszellen einzuschleusen. Lytische Bakteriophagen haben verschiedene Systeme entwickelt, um nach Abschluss der Virusreplikation die neue Phagengeneration freizusetzen. Aufgrund der hohen Toxizität ist eine äußerst genaue Regulation der Lysedeterminanten erforderlich. Zunächst wurde das Lyseprotein E des Phagen  $\phi\text{X174}$  mit dem neuartigen Zwei-Phasen-Expressionssystem (ZPES) für toxische Antigene in Salmonellen kombiniert (Yan und Meyer 1996). Das ZPES basiert auf dem Prinzip der stellenspezifischen Rekombination zur Inversion eines bestimmten DNA-Abschnitts, entlehnt dem Variationssystem des Bakteriophagen Mu zur Veränderung der Schwanzfaserstruktur (Plasterk et al. 1983). Die konstitutive Expression der Invertase Gin führt zur plötzlichen Inversion eines definierten Fragmentes des bakteriellen Chromosoms in einem Teil der Salmonellen der wachsenden Kultur. In Abhängigkeit von der Orientierung dieses invertierbaren Fragmentes wird T7-RNA-Polymerase (T7RNAP) produziert und startet die Transkription eines unter Kontrolle des T7-Promotors stehenden Gens (Abb. 14). Die Inversionsfrequenz des chromosomalen Fragmentes ist abhängig von der Konzentration der Invertase Gin. Der Stamm SL3261::VO330B::YZ220 exprimiert Gin auf relativ hohem Niveau, so dass in ca. 20% der Bakterien einer Generation während des logarithmischen Wachstums eine Inversion des variablen Fragmentes erfolgt (persönliche Mitteilung von V. Spehr).



**Abb. 14: Prinzip des Zwei-Phasen-Expressionssystems.** Das invertierbare Element der chromosomalen ZPES-Kassette ::YZ220 des Stammes SL3261::VO330B::YZ220 trägt die T7RNAP in einer bestimmten Orientierung. Die Expression von T7RNAP erfolgt nur dann, wenn die durch Gin-vermittelte Inversion des chromosomalen Fragments das T7RNAP-Gen unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors in der rechten terminalen Sequenz des Tn7-Mini-Transposons gerät. T7RNAP vermittelt in der Folge die Expression des plasmidkodierten toxischen Antigens unter Kontrolle des P<sub>T7</sub>-Promotors. Das Kanamycin-Resistenzgen befindet sich in der invertierbaren Kassette in entgegengesetzter Orientierung zu T7RNAP und ermöglicht die Selektion der in der „Aus-Position“ befindlichen Bakterien. Eine andere ZPES-Variante stellt das ::YZ84-abgeleitete ZPES-System ::VO170 dar (siehe Abb. 5), dort befindet sich der  $\lambda$ -P<sub>L</sub> Promotor innerhalb des phasenvariablen Fragmentes.

Das Lyseprotein E des Phagen  $\phi$ X174 ist ein sehr effizienter Inhibitor der Translokase MraY (Bernhardt et al. 2000). Dieses Enzym katalysiert die Formierung des ersten Lipidintermediates während der Peptidoglykansynthese. Weniger als hundert Protein-E-Moleküle führen bereits zum Absterben der Zelle (Maratea et al. 1985). Gen-E wurde aus der DNA des Phagen  $\phi$ X174 mittels PCR amplifiziert und in den pET11a-Vektor unter die Kontrolle des T7-Promotors gebracht (pHL102). In Abwesenheit der T7RNAP ist die Insertionsstelle des Vektors transkriptionell inaktiv. Die Bindung des plasmidkodierten Lac-Repressors (LacI) an die aufwärts vom T7-Promotor gelagerte spezifische DNA-Bindungsstelle verhindert die Transkription bei einer geringen T7RNAP-Hintergrundexpression. Der pET11a-Vektor basiert auf dem Niedrigkopienzahlplasmid pBR322, so dass nur eine moderate Anzahl von Plasmidmolekülen je Bakterium propagiert wird. Unter diesen Voraussetzungen ist die Transformation des generierten Plasmids pHL102 in den Stamm SL3261::VO330B::YZ220 möglich. Das Wachstum dieses Stammes wurde mit dem ZPES-freien Ausgangsstamm SL3261, ebenfalls transformiert mit pHL102, verglichen (Abb. 15A). In der Kultur wachsen beide Stämme mit ähnlicher Rate, jedoch kommt es nur in der Kultur des Stammes SL3261::VO330B::YZ220[pHL102] während der späten logarithmischen Phase zunehmend zur Akkumulation eines krümlig-fädigen Niederschlages (Abb. 15B). Dieser Niederschlag entsteht durch die T7RNAP-induzierte, Protein-E-vermittelte spontane Autolyse eines Teils der Bakterien in der wachsenden Kultur und ähnelt den durch die Antibiotika-induzierte Lyse entstehenden bakteriellen Zelltrümmern (Abb. 15B).

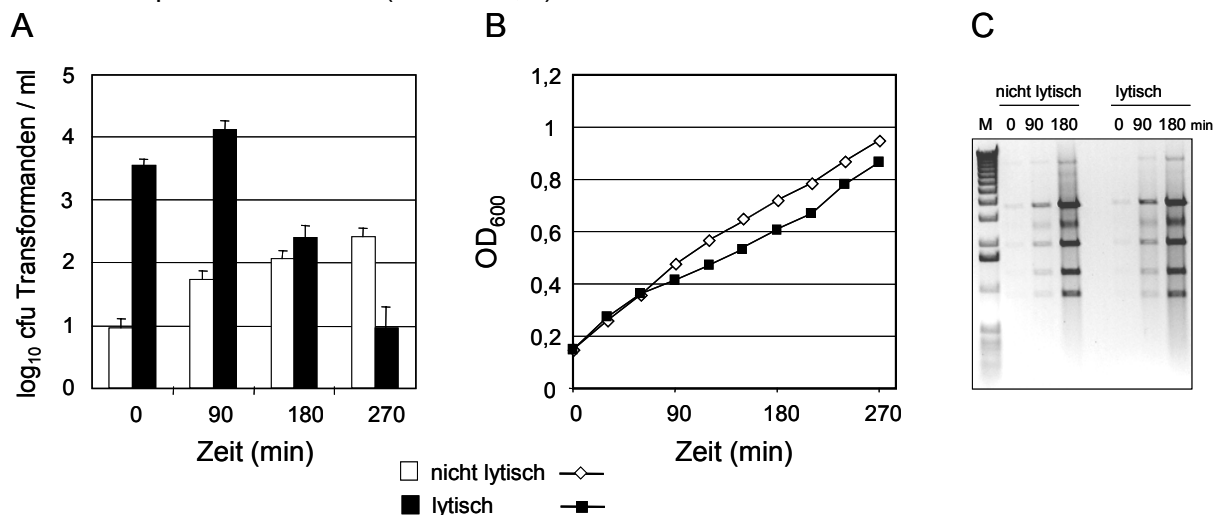


**Abb. 15: ZPES-induzierte, Protein-E-vermittelte Autolyse von Salmonellen in der Kultur.** Ampicillin-supplementierte Schüttelkulturen wurden mit dem nicht-lytischen Stamm SL3261[pHL102] sowie dem autolytischen Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL102] inokuliert und die Wachstumskurve aufgenommen. Zum Vergleich wurde der Ampicillin-sensitive Stamm SL3261[pEGFP-C1] zunächst in Kanamycin-supplementiertem Medium angezogen und dieser Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 0,35 die doppelte Standard-Menge an Ampicillin zur Induktion der bakteriellen Lyse zugegeben (A, ausgefüllter Pfeil). 6 Stunden nach der Zugabe von Ampicillin wurden je 2 ml der drei Kulturen in die Vertiefungen einer 24well-Platte überführt, ruhig gestellt und schließlich der sedimentierte Niederschlag auf dem Boden der Vertiefung fotografiert (B). Schwarzer Balken = 5 mm.

### 6.3.2 Protein-E-vermittelte Freisetzung von Plasmid-DNA und Listeriolysin O

In der eukaryontischen Wirtszelle befinden sich die Salmonellen in einer membranumgrenzten Vakuole, dem Phagosom. Die Perforation der phagosomalen Membran ist für die Passage der durch die bakterielle Lyse freigesetzten Plasmid-DNA in das Zytoplasma eine weitere wichtige Voraussetzung. Listeriolysin O (LLO) ist für diesen Zweck prädestiniert (Dramsi und Cossart 2002). Die Insertion einer konstitutiven LLO-Expressionskassette in pHL102 ergab das Konstrukt pHL138. Die Expression von LLO wird durch den Promotor des Tetrazyklin-Gens aus dem Plasmid pACYC184 gesteuert. Der Stamm SL3261 sowie der ZPES-Stamm SL3261::VO330B::YZ220 wurden mit dem Plasmid pHL138 transformiert und die Freisetzung von Plasmid-DNA und zytoplasmatischen Proteinen in den Kulturüberständen untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde aus den Überständen der wachsenden Kulturen Plasmid-DNA isoliert, in kompetente *E.coli* transformiert und diese anschließend seriell auf Ampicillin-Platten ausgebracht. Die Koloniezahl wurde hier als relatives Maß für den Gehalt an Plasmid-DNA im Medium verwendet. In der Kultur des autolytischen Stammes SL3261::VO330B::YZ220[pHL138] ist bereits während der frühen Phase des logarithmischen

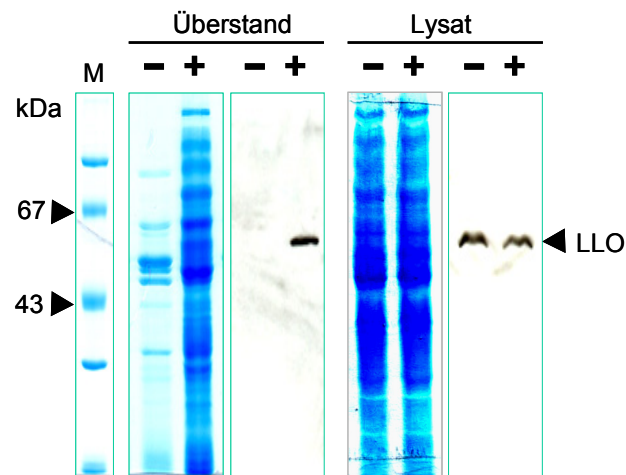
Wachstums eine hohe DNA-Konzentration im Medium messbar (Abb. 16A). Bei einer  $OD_{600}$  von ca. 0,4 kann etwa tausendfach mehr Plasmid-DNA aus dem Medium isoliert werden als aus dem Kulturüberstand des nicht-lytischen Vergleichstammes SL3261[pHL138]. Zu einem späteren Zeitpunkt nimmt jedoch der DNA-Gehalt im Medium des lytischen Stammes drastisch ab, verursacht durch die Akkumulation von Nukleasen, die ebenfalls durch die bakterielle Desintegration freigesetzt werden (Kloos et al. 1994). Die Wachstumsrate des autolytischen Stammes SL3261::VO330B::YZ220[pHL138] ist mit der des herkömmlichen Stammes SL3262[pHL138] in der frühen Phase vergleichbar, und der Gehalt an Plasmid-DNA in den Bakterien beider Stämme ist im Gegensatz zum Überstand in verschiedenen Wachstumsphasen identisch (Abb. 16B,C).



**Abb. 16: Freisetzung von Plasmid-DNA aus autolytischen Salmonellen in den Kulturüberstand.**

A) Plasmid-DNA wurde aus den Überständen der Kulturen SL3262[pHL138] (nicht lytisch) und SL3261::VO330B::YZ220[pHL138] (lytisch) in verschiedenen Wachstumsphasen extrahiert und durch Transformation in *E.coli* quantifiziert. Der Zeitpunkt Null entspricht einer  $OD_{600}$  von 0,1. B) Das Wachstum beider Stämme wurde anhand der  $OD_{600}$  verfolgt. C) Zu den bezeichneten Zeitpunkten wurde Plasmid-DNA aus jeweils 400  $\mu$ l der Kulturen beider Stämme isoliert, mit *Bam*HI sowie *Xmn*I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

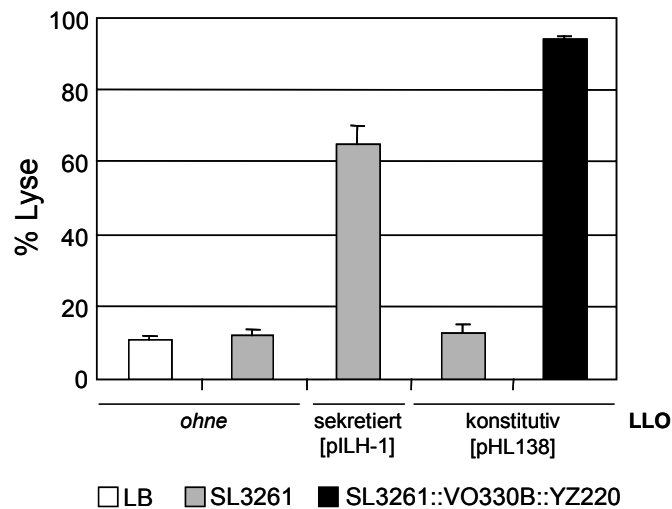
In der späten logarithmischen Phase wurden Überstände der nicht-lytischen sowie der lytischen Kultur gewonnen, die Proteine gefällt und mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Coomassie-Färbung des Gels zeigt in der Bahn des nicht-lytischen Stammes die typischen Banden von Salmonellen sezernierter Proteine, z.B. von Flagellinen (Abb.17)(Komoriya et al. 1999). Im Gegensatz dazu wurden aus dem Überstand der lytischen Kultur eine Bandbreite von Proteinen gewonnen. Ein parallel gelaufenes Gel wurde zur spezifischen Detektion von LLO geblottet. Während im Überstand des nicht-lytischen Stammes kein LLO nachgewiesen wurde, konnte LLO im Medium des lytischen Stammes detektiert werden (Abb. 17). Die Signale für LLO im bakteriellen Ganzzelllysate sind vergleichbar.



**Abb. 17: Freisetzung von Proteinen aus autolytischen Salmonellen in den Kulturüberstand.**

Kulturüberstände und Bakterien der Stämme SL3262[pHL138] (nicht lytisch = minus) und SL3261::VO330B::YZ220[pHL138] (lytisch = plus) wurden bei einer  $OD_{600}$  von 0,8 gewonnen. Die Proteine der Überstände wurden durch TCA-Fällung konzentriert und parallel zu den bakteriellen Lysaten in der SDS-PAGE aufgetrennt. Proteine wurden im Coomassie-Färbebad sichtbar gemacht sowie LLO im Immunoblot spezifisch nachgewiesen.

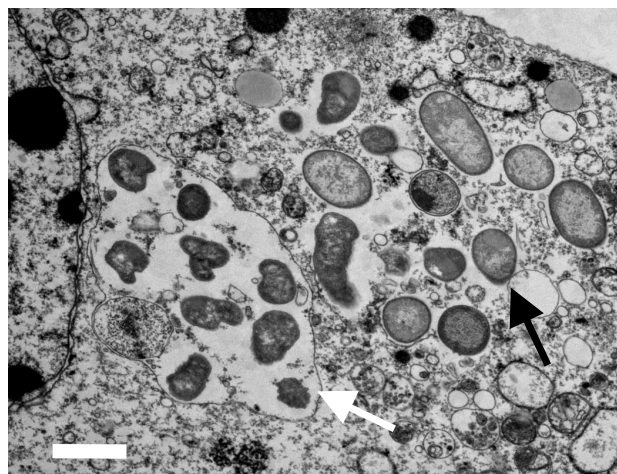
Die *E.coli-hlyA*-System-vermittelte Sekretion von aktivem LLO durch Salmonellen wurde erfolgreich zur Perforation der phagosomalen Membran eingesetzt, so dass Salmonellen aus dem Phagosom in das Wirtszellzytoplasma entweichen konnten (Gentschev et al. 1995). Dieses plasmidkodierte LLO-Sekretionssystem pILH-1 wurde in den Stamm SL3261 transformiert und diese Bakterien hinsichtlich der LLO-Freisetzung mit dem neuartigen autolytischen Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL138] im Schafserythrozyten-Hämolyseassay verglichen (Abb. 18). Die T7RNAP-induzierte, Protein-E-vermittelte Lyse in einem geringen Anteil der Bakterien der wachsenden Kultur des lytischen Stammes führt zur Freisetzung von mehr aktivem LLO in den Kulturüberstand als die kontinuierliche *E.coli-hlyA*-System-vermittelte LLO-Sekretion aller Bakterien des Stammes SL3261[pILH-1]. Da bei der spontanen Autolyse LLO gemeinsam mit Plasmid-DNA an der Bruchstelle der Bakterienhülle austritt, wird möglicherweise die phagosomale Membran in unmittelbarer Nähe zur Plasmid-DNA am ehesten zerstört und somit die Effizienz der DNA-Freisetzung in das Zytoplasma gesteigert.



**Abb. 18: Freisetzung von aktivem LLO aus autolytischen Salmonellen in den Kulturüberstand.**

Die hämolytische Aktivität von LLO im Kulturüberstand des autolytischen, konstitutiv LLO-exprimierenden Stammes SL3261::VO330B::YZ220[pHL138] wurde mit der Aktivität von Überständen des Hintergrundstammes SL3261, des nicht-autolytischen, konstitutiv LLO-exprimierenden Stammes SL3261[pHL138] sowie des LLO-sekretierenden Stammes SL3261[pILH-1] verglichen. Überstände wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 abgenommen, mit Schafserythrozyten inkubiert und anhand des durch die Erythrozytenlyse freigesetzten Hämoglobins die relative Aktivität von LLO im Überstand bestimmt. Die vollständige Erythrozytenlyse (100%) wurde durch Inkubation mit 1%igem Triton-X-100 in PBS erreicht.

Um in der infizierten Wirtszelle die bakterielle Lyse und die membranperforierende Wirkung von freigesetztem LLO zu zeigen, wurden COS7-Zellen mit dem nicht-lytischen und dem autolytischen Stamm infiziert und nach achttündiger Infektion für die Elektronenmikroskopie fixiert. Nur in der mit dem autolytischen Stamm infizierten Probe konnten frei im Zytoplasma vorkommende Salmonellen detektiert werden (Abb. 19).

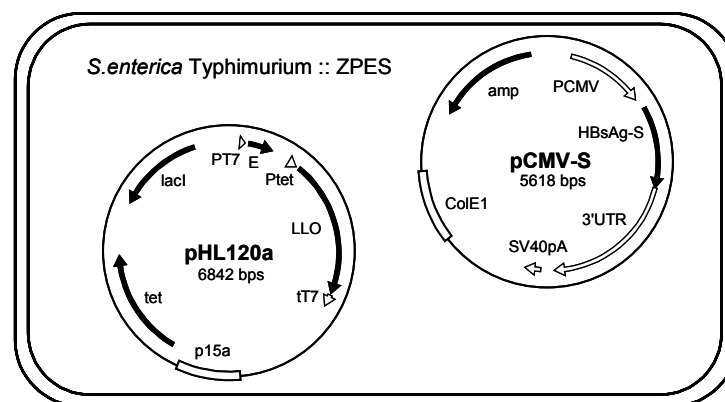


**Abb. 19: LLO-exprimierende, autolytische Salmonellen entweichen in das Zytoplasma infizierter COS7-Zellen.** Die Zellen wurden mit dem autolytischen Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL138] infiziert und nach 8 Stunden für die Elektronenmikroskopie fixiert. Der weiße Pfeil weist auf eine membranumschlossene, Salmonellen-gefüllte Vakuole, dagegen weist der schwarze Pfeil auf frei im Zytoplasma befindliche Salmonellen (weißer Balken = 1 µm).



### 6.3.3 Autolytisches Salmonellen-DNA-Vektorsystem basierend auf kompatiblen Plasmiden

Um den autolytischen Salmonellen-Impfstamm für den Transfer eukaryontischer Expressionsplasmide einzusetzen, wurden die Expressionskassetten für Protein-E und LLO aus dem Plasmid pHL138 in den pUC-kompatiblen Plasmidvektor pACYC184 kloniert. Das resultierende Plasmid pHL120a wurde anschließend zusammen mit dem GFP-Reporterplasmid pHL4 oder dem HBsAg-Expressionsvektor pCMV-S in die ZPES-Stämme SL3261::VO330B::YZ220 sowie SL3261::VO170 transformiert (Abb. 20). Im Gegensatz zu SL3261::VO330B::YZ220, dem ZPES-Stamm mit einer ca. 20%igen Inversionsrate, erfolgt in dem Stamm SL3261::VO170 die chromosomale Inversion des variablen Fragments lediglich in ca. 3% der Bakterien je Generation (persönliche Mitteilung von V. Spehr). Die Infektion von COS7-Zellen mit den lytischen kotransformierten Stämmen führte nicht zu einer Reportergenexpression. Die beiden kotransformierten Plasmide sind in Salmonellen ohne selektiven Druck sehr instabil. Bereits zwei Stunden nach Kultivierung im Medium ohne Antibiotika wurden keine koresistenten Bakterien mehr detektiert. Die kotransformierten autolytischen Stämme mit dem HBsAg-Expressionsvektor pCMV-S wurden für eine initiale orale Immunisierung verwendet und mit der intramuskulären DNA-Vakzinierung verglichen. Während eine einmalige intramuskuläre DNA-Injektion eine deutliche HBsAg-spezifische Serum-IgG-Antwort induzierte, wurden keine HBsAg-spezifischen Antikörper im Serum mehrmals mit der oralen Vakzine immunisierter Tiere detektiert.



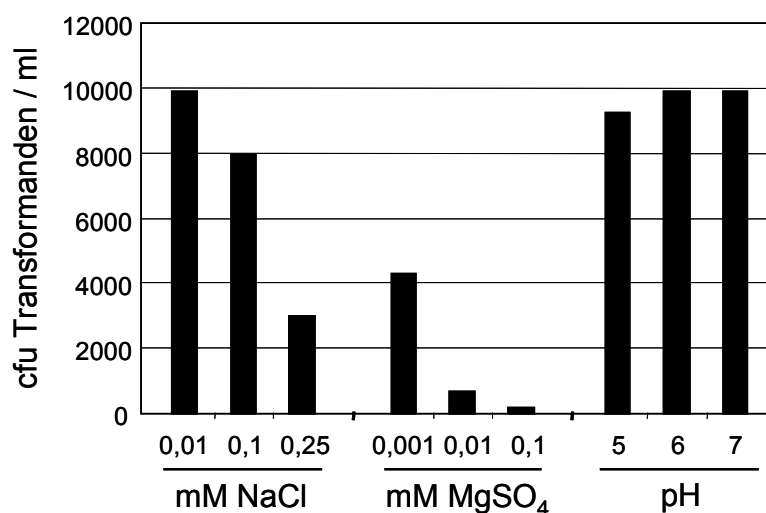
**Abb. 20: Autolytischer Salmonellen-DNA-Vektor basierend auf kompatiblen Plasmiden.** Das Niedrigkopienzahlplasmid pHL120a trägt das T7RNAP-induzierbare Lysegen E sowie die konstitutive LLO-Expressionskassette. Das compatible, pUC-abgeleitete Hochkopienzahlplasmid pCMV-S trägt die eukaryontische HBsAg-Expressionskassette.

## 6.4 Optimierung des autolytischen Salmonellen-DNA-Vektorsystems

### 6.4.1 Lambda-Lyseoperon als Alternative zu Protein E

Nach der Zellinvasion residieren Salmonellen in einem Phagosom, dessen Gestalt sie durch den direkten Eintrag verschiedener Faktoren in das Zytoplasma der infizierten Wirtszelle aktiv beeinflussen und somit in eine geschützte Nische für die eigene Proliferation verwandeln (Gorvel und Meresse 2001). Dieses Salmonellen-enhaltende Phagosom ist beispielsweise

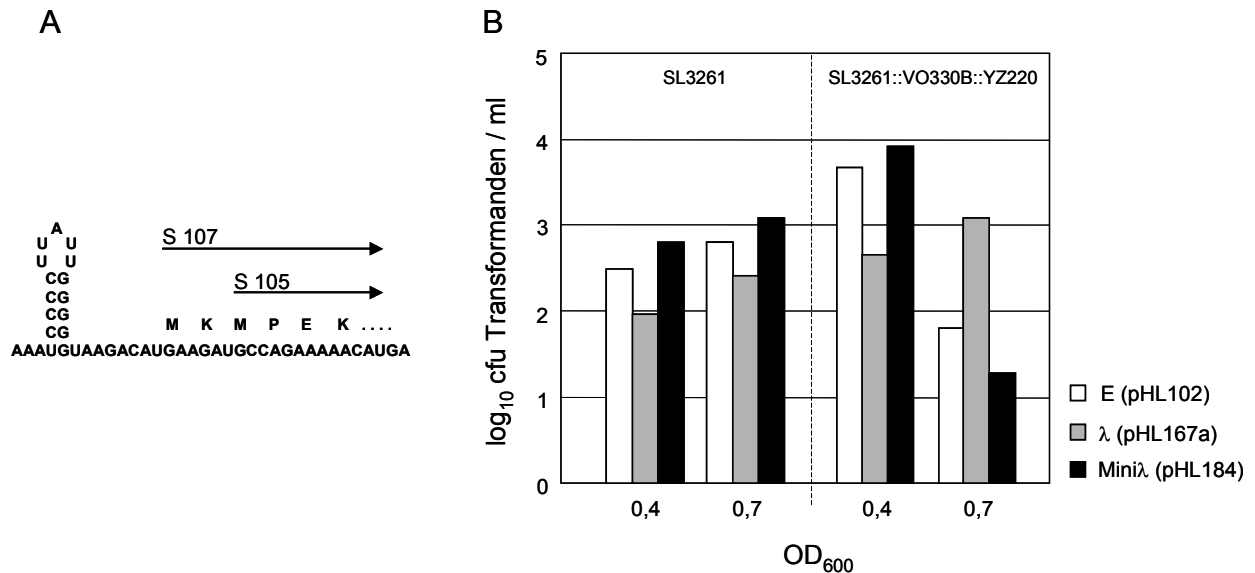
gekennzeichnet durch einen schwach sauren pH-Wert (Garcia-del Portillo et al. 1992; Rathman et al. 1996), eine niedrige Phosphat-Konzentration sowie eine niedrige Konzentration an divalenten Kationen (Garcia-del Portillo et al. 1992; Garcia et al. 1996). Die Protein-E-vermittelte, bakterielle Lyse wird unter verschiedenen Medienbedingungen inhibiert, z.B. durch einen niedrigen pH-Wert oder Zugabe von  $\text{MgSO}_4$  in das Medium (Lubitz et al. 1984). Möglicherweise verhindern die spezifischen physiologischen Bedingungen des phagosomalen Kompartimentes die lytische Wirkung des ZPES-induziert exprimierten Protein-E. Die Freisetzung von Plasmid-DNA durch den lytischen Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL102] wurde in Medien unterschiedlicher pH-Werte sowie verschiedener NaCl- und  $\text{MgSO}_4$ -Konzentrationen analysiert (Abb.21). Während die lytische Aktivität von Protein-E im pH-Bereich 5 - 7 vergleichbar ist, wird die Protein-E-vermittelte Lyse mit zunehmender Konzentration von NaCl und  $\text{MgSO}_4$  inhibiert. Bereits in geringster Konzentration schränkt  $\text{MgSO}_4$  die Protein-E-vermittelte bakterielle Lyse stark ein. Dieser Effekt ist für die Lyse, ausgelöst durch das Lyseoperon des Phagen  $\lambda$ , nicht bekannt. Das Lyse-System des Phagen  $\lambda$  unterscheidet sich grundsätzlich von dem des Phagen  $\phi\text{X174}$  und ist möglicherweise für ein autolytisches Salmonellen-DNA-Vektorsystem besser geeignet.



**Abb. 21: Einfluss von Salzkonzentration und pH-Wert auf die Protein-E-vermittelte bakterielle Lyse.** LB-Medien wurden jeweils auf die angegebenen Salzkonzentrationen oder pH-Werte eingestellt und mit dem Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL102] angeimpft. Plasmid-DNA wurde aus den Überständen der Kulturen bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 isoliert und zur Quantifizierung in *E.coli* transformiert.

Die Protein-E-vermittelte, bakterielle Lyse führt neben der Freisetzung von Plasmid-DNA auch zur Freisetzung von zytoplasmatischen und periplasmatischen Proteinen, unter anderen von Nukleasen. Diese Enzyme bauen wahrscheinlich einen Teil der freigesetzten Plasmid-DNA ab, so dass die Effizienz des DNA-Transfers aus den Salmonellen in den Kern der infizierten Wirtszelle gemindert wird. Im Gegensatz zur Protein-E-vermittelten Lyse wurde für die  $\lambda$ -Lyseoperon-induzierte bakterielle Lyse beschrieben, dass freigesetzte Plasmid-DNA nicht durch Nukleasen abgebaut wird (Kloos et al. 1994). Das vollständige  $\lambda$ -Lyseoperon wurde unter die Kontrolle des T7-Promotors gesetzt und das resultierende Plasmid pHL167a vor dem Hintergrund des ZPES-Stammes SL3261::VO330B::YZ220 mit dem äquivalenten Protein-E-

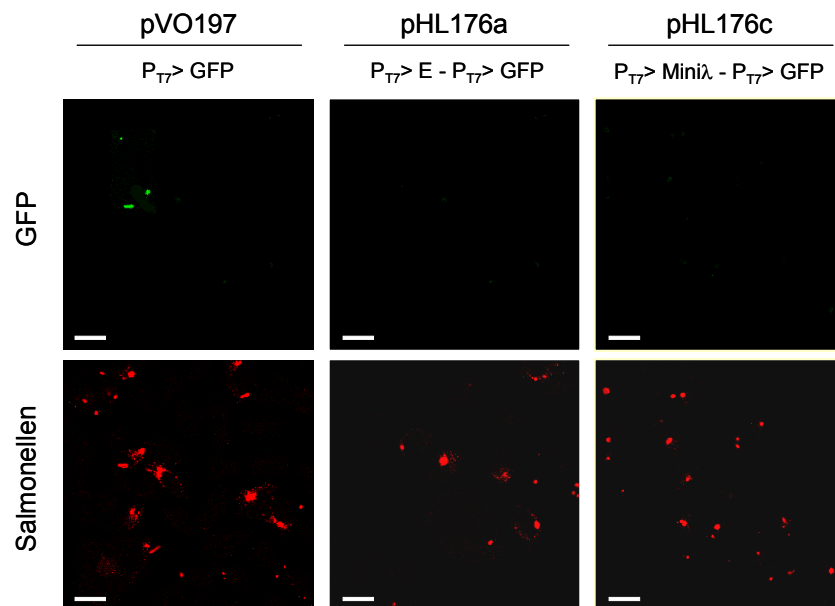
kodierenden Plasmid pHL102 verglichen. Das vollständige  $\lambda$ -Lyseoperon vermittelte jedoch nur eine minimale bakterielle Lyse. Neue Erkenntnisse über die Regulation der  $\lambda$ -Lyseoperons deckten die Ursache dafür auf (Grundling et al. 2000). Die  $\lambda$ -induzierte Lyse erfordert die konzertierte Aktion der Genprodukte S und R. Das als Holin bezeichnete Protein S macht die innere Bakterienmembran durchlässig, so dass Protein R, eine Endopeptidase, in den periplasmatischen Raum eindringen und das Peptidoglykan abbauen kann. Grundling et al. fanden heraus, dass von dem S-Gen zwei Produkte abgelesen werden, die sich nur durch zwei Aminosäuren am N-Terminus unterscheiden (Abb. 22A). Das längere Genprodukt S107 ist der Inhibitor des eigentlichen Holins S105. Offenbar wurde in dem Plasmid pHL167a das komplette Lyseoperon für die T7RNAP-vermittelte Expression in einer Konstellation kloniert, in der die Expression des Inhibitors favorisiert und damit die bakterielle Lyse unterdrückt wird. Die erneute Klonierung eines Teils des  $\lambda$ -Lyseoperons, kodierend nur für S105 und R, lieferte eine stark lytische, als Mini $\lambda$  bezeichnete Determinante (pHL184). Die neue Lysedeterminante wurde mit Protein-E, sowie dem vollständigen  $\lambda$ -Lyseoperon hinsichtlich der Freisetzung von Plasmid-DNA verglichen (Abb. 22B). In der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,4$ ) führt die ZPES-induzierte, Mini $\lambda$ -vermittelte Lyse zu einer etwas stärkeren Freisetzung von Plasmid-DNA in das Medium im Vergleich zu Gen-E, während das vollständige  $\lambda$ -Lyseoperon nur eine schwache lytische Aktivität vermittelt. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Kloos et al. wurde jedoch auch in der späten logarithmischen Phase ( $OD_{600}=0,7$ ) die durch Mini $\lambda$ -vermittelte Lyse freigesetzte DNA nukleolytisch abgebaut. In dem T7RNAP-freien Stamm SL3261 vermitteln die Konstrukte pHL102 sowie pHL184 eine schwache lytische Hintergrundaktivität, so dass Plasmid-DNA in relativ geringer Menge in das Medium freigesetzt wird. Mit diesen Stämmen, aber auch mit dem Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL167a], ist in der späten logarithmischen Phase noch eine Zunahme der DNA-Konzentration in dem Medium zu beobachten, da die Konzentration der Nukleasen in den Kulturüberständen zu diesem Zeitpunkt noch zu niedrig ist.



**Abb. 22: Vergleich der Lysedeterminanten Gen-E, λ-Lyseoperon und Miniλ anhand der Freisetzung von Plasmid-DNA in die Kulturüberstände.** A) Startmotiv der mRNA zur Translation zwei verschiedener S-Genprodukte, dem Holin (S 105) und dem Holininhibitor (S 107) (Grundling et al. 2000). B) Plasmid-DNA wurde aus den Überständen der bezeichneten Kulturen in der mittleren und späten logarithmischen Wachstumsphase extrahiert und zur Quantifizierung in *E.coli* transformiert.

Voraussetzung für die Autolyse der Salmonellen in der infizierten Wirtszelle ist sowohl die Funktionsfähigkeit der Lysedeterminante als auch die Funktion des ZPES. Möglicherweise haben die Wachstumsbedingungen in der infizierten Wirtszelle einen Einfluss auf die Aktivität der Invertase Gin und somit auf die Inversionsrate des chromosomalen Fragments. Die Funktion des ZPES intrazellulärer Salmonellen wurde mittels der T7RNAP-induzierten GFP-Expression nachgewiesen. COS7-Zellen wurden mit dem Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pVO197] infiziert, nach zwölf Stunden fixiert und Salmonellen-spezifisch gefärbt. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Anteil GFP-positiver Bakterien an der Gesamtzahl intrazellulärer Salmonellen ca. 5% (Abb. 23). Vor der Infektion wurde durch Selektion mit Kanamycin sichergestellt, dass sich in der Infektionskultur keine GFP-positiven Salmonellen befinden. Drei Stunden nach der Infektion wurden in COS7-Zellen nur vereinzelt GFP-positive Salmonellen gefunden (<1%). Deutlich wird, dass im Verlauf der intrazellulären Proliferation ein Teil der Salmonellen des Stammes SL3261::VO330B::YZ220[pVO197] die T7RNAP-vermittelte GFP-Expression initiiert. Der Stamm SL3261::VO170 wurde für dieses Experiment nicht verwendet, da in der „Aus-Position“-befindliche Bakterien mit Kanamycin nicht selektiert werden können. Als nächstes wurde die intrazelluläre Funktion der Suizidsysteme, basierend auf GenE und Miniλ, untersucht. Dazu wurde die Expressionskassette für GFP mit der Kassette der jeweiligen Lysedeterminante gekoppelt (Plasmide pHL176a und 176c). In dieser Anordnung ist die T7RNAP-induzierte GFP-Expression in der infizierten Wirtszelle nur dann möglich, wenn die Lysedeterminante intrazellulär wirksam inhibiert wird. Es konnten jedoch keine GFP-positiven Bakterien des Stammes SL3261::VO330B::YZ220[pHL176a] bzw. SL3261::VO330B::YZ220[pHL176c] detektiert werden (Abb. 23). Demzufolge werden alle Bakterien, in denen die T7RNAP-Expression aufgrund des chromosomalen Rearrangements

einsetzt, sehr schnell durch Expression der Lysedeterminante abgetötet. Beide Lysedeterminanten scheinen daher für die Vermittlung der Autolyse eines Salmonellen-DNA-Vektors in der infizierten Wirtszelle geeignet zu sein.

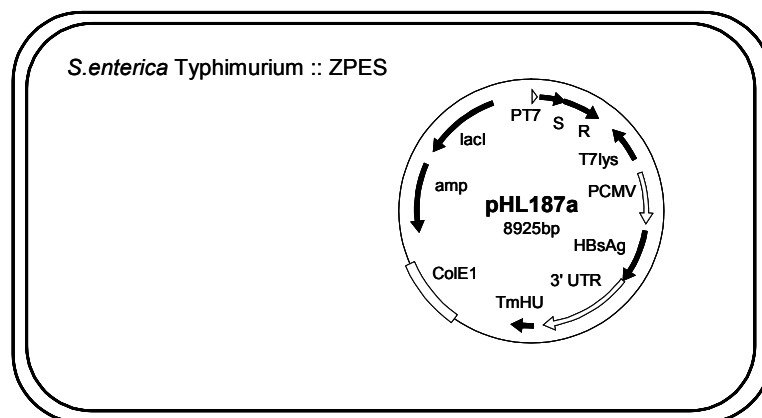


**Abb. 23: T7RNAP-vermittelte Expression von GFP gekoppelt mit der Expression der Lysedeterminante Gen-E oder Miniλ.** Der ZPES-Stamm SL3261::VO330B::YZ220 wurde mit den Plasmiden pVO197, pHL176a sowie pHL176c transformiert. COS7-Zellen wurden mit diesen Stämmen infiziert, nach zwölf Stunden fixiert und Salmonellen-spezifisch mit dem Cy3-Konjugat gefärbt. Die Salmonellen-Färbung und die GFP-Expression wurden mittels konfokaler Mikroskopie verglichen. Nur mit pVO197, dem Konstrukt ohne Lysedeterminante, wurden GFP-positive Salmonellen in den infizierten Wirtszellen detektiert. (weißer Balken = 40 µm)

#### 6.4.2 Autolytisches Salmonellen-DNA-Vektorsystem basierend auf einem Plasmid

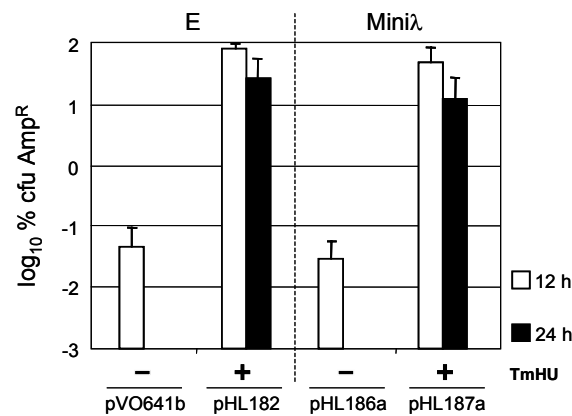
Die Verwendung autolytischer Salmonellen als DNA-Vektoren erfordert neben der Erhaltung der eukaryontischen Expressionskassette die Stabilisierung der Lysedeterminante sowie weiterer Komponenten, wie z.B. der LLO-Expressionskassette. Die getrennte Platzierung dieser Module auf kompatiblen Plasmiden führt in Abwesenheit des selektiven Drucks durch Antibiotika zum schnellen Verlust dieser Plasmidkombination (siehe Abschnitt 6.3.3). Um das System zu stabilisieren, wurde deshalb die Vereinigung aller Module auf einem Plasmidvektor angestrebt. Die Integration der LLO-Kassette aus dem Plasmid pHL138 in das HBsAg-Expressionsplasmid pCMV-S war nicht möglich. Die Klonierung scheiterte vermutlich an der Toxizität dieser Kassette vor dem Hintergrund des Hochkopienzahlplasmids. Die Integration der Lysedeterminanten Gen-E oder Miniλ in pCMV-S war möglich, jedoch führte dies zu einer deutlichen Reduktion der Plasmidmolekülzahl je Bakterium. Um in den ZPES-Stämmen eine weitere Destabilisierung der integrierten Konstrukte durch eine eventuelle minimale T7RNAP-Hintergrundaktivität zu unterbinden, wurde T7-Lysozym (T7-Lys) als T7RNAP-Inhibitor in der dazu optimalen Orientierung in die Expressionskassetten für Protein-E und Miniλ eingefügt

(pVO641b und pHL186a, siehe Abb. 7). Eine weitere Kassette zur moderaten konstitutiven Expression von TmHU, dem Histon-ähnlichen Protein aus *Thermotoga maritima*, ergänzt das Ein-Plasmid-System (Plasmide pHL182 und pHL187a, Abb. 24). TmHU kommt in Betracht, weil mehrere Eigenschaften dieses Proteins potentiell für den DNA-Transfer aus Salmonellen in den Zellkern der infizierten Zelle förderlich sind. TmHU ist ein sehr effizientes, neuartiges DNA-Transfektionagens (Esser et al. 2000). Es hat eine Größe von 90 Aminosäuren, ist positiv geladen, bindet unspezifisch DNA mit moderater Affinität und verfügt über ein klassisches Kernlokalisierungssignal. Vermutlich schützt TmHU durch unspezifische DNA-Bindung Plasmid-DNA vor Nukleaseabbau, befördert die Freisetzung der DNA aus dem endosomalen Kompartiment und vermittelt den gezielten DNA-Transfer in den Zellkern. Darüber hinaus kann TmHU problemlos in Salmonellen auf moderatem Niveau exprimiert werden.



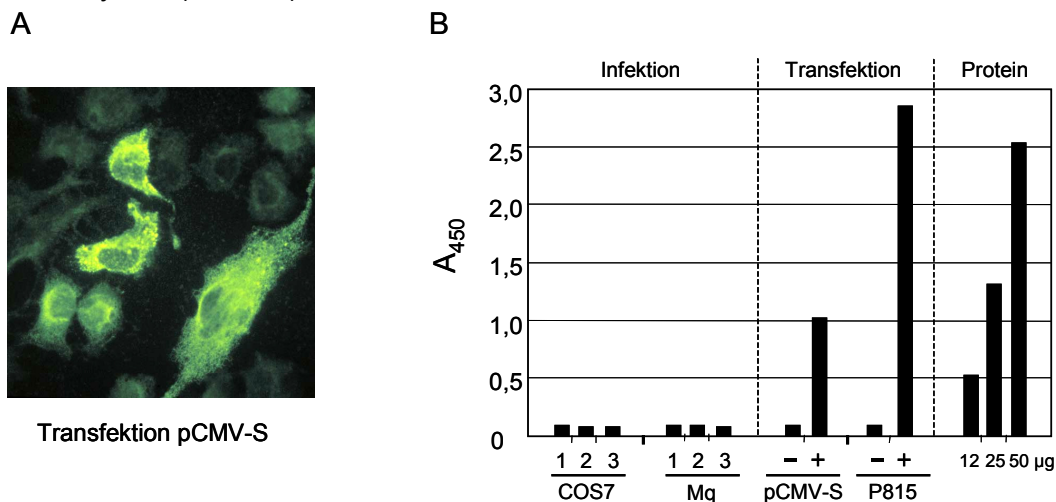
**Abb. 24: Optimiertes autolytisches Salmonellen-DNA-Vektorsystem.** Vor dem Hintergrund eines ZPES-Salmonellen-Impfstammes vermittelt die T7RNAP-induzierbare Kassette mit der Lysedeterminante (Miniλ in pHL187a) die spontane bakterielle Autolyse. T7-Lysozym (T7lys) sowie der Lac-Repressor (lacI) als Bestandteil dieser Kassette vermindern dabei eine minimale T7RNAP-Hintergrundaktivität während des nicht-induzierten Zustandes. Die TmHU-Expressionskassette ist für die Verbesserung des DNA-Transfers in den Zellkern bestimmt und trägt zur Stabilisierung des Plasmids bei. Die durch den CMV-Promotor/Enhancer (PCMV) gesteuerte HBsAg-Expressionskassette sowie das Plasmidrückgrat entstammt dem ursprünglichen HBsAg-DNA-Vakzinvektor pCMV-S.

Unerwartet war die Beobachtung, dass die Integration der TmHU-Expressionskassette in die Ein-Plasmid-Konstrukte zu deren Stabilisierung in der Kultur führte (Abb. 25). Im Ergebnis der Optimierungsschritte erschienen die autolytischen Impfstämme basierend auf den Konstrukten pHL182 sowie pHL187a am besten für den Salmonellen-vermittelten DNA-Transfer in die infizierte Wirtszelle geeignet.



**Abb. 25: Einfluss konstitutiver TmHU-Expression auf die Plasmidstabilität.** Der Stamm SL3261::VO170 wurde mit den Plasmiden ohne TmHU-Expressionskassette pVO641b und pHL186a sowie den Plasmiden mit der TmHU-Kassette pHL182, und pHL187a transformiert. Der prozentuale Anteil plasmidtragender Salmonellen (%Amp<sup>R</sup>) wurde durch Plattierung nicht-selektiv kultivierter Bakterien auf Platten mit und ohne Ampicillin bestimmt.

In der Zellkultur konnte jedoch auch mit den optimierten Ein-Plasmid-Konstrukten pHL182 und pHL187a vor dem Hintergrund der ZPES-Stämme SL3261::VO170 sowie SL3261::VO330B::YZ220 weder in COS7-Zellen noch in primären Peritonealmakrophagen eine HBsAg-Transgenexpression erzielt werden. Infizierte oder zum Vergleich transfizierte Zellen wurden entweder fixiert und HBsAg-spezifisch gefärbt oder deren Lysate mit dem HBsAg-ELISA-Kit analysiert (Abb. 26).



**Abb. 26: Nachweis von HBsAg in infizierten oder transfizierten Zellen *in vitro*.** A) HBsAg-spezifische Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten COS7-Zellen. B) Zelllysate wurden mit dem Biokit HBsAg-ELISA-Kit analysiert. COS7-Zellen und Peritonealmakrophagen (Mq) von Balb/c-Mäusen wurden mit den Stämmen (1) SL7207, (2) SL7207[pCMV-S] und (3) SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] infiziert (MOI : COS7 = 100, Mq = 10). Als Positivkontrollen wurden liposomal transfizierte COS7-Zellen (+ = 10<sup>6</sup> Zellen mit 4 μg pCMV-S transfiziert, - = nicht transfiziert), die stabil HBsAg-transfizierte Mastrozytomazelllinie P815-S (+ P815-S, - P815) sowie das aufgereinigte HBsAg-Protein verwendet. Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion oder Transfektion geerntet. Für den ELISA wurde jeweils das Lysat von ca. 5 x 10<sup>4</sup> Zellen eingesetzt.

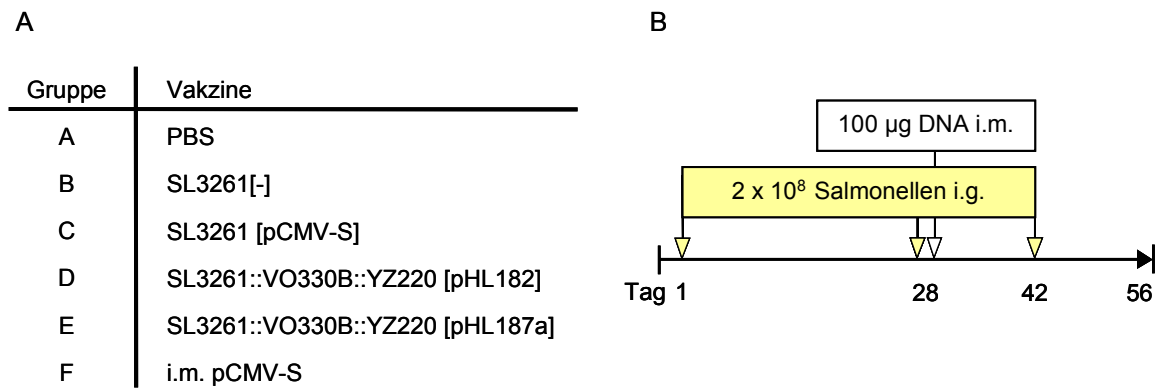
## 6.5 Orale HBsAg-DNA-Vakzinierung mit autolytischen Salmonellen

### 6.5.1 Vergleich optimierter Ein-Plasmid-Konstrukte

Die Immunisierung mit dem rekombinanten HBsAg-Protein induziert vor allem eine starke systemische Antikörperantwort, jedoch keine CTL-Antwort. Im Gegensatz dazu werden durch die intramuskuläre DNA-Vakzinierung sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten, insbesondere CTL, induziert. Die meisten HBsAg-spezifischen Antikörper erkennen eine bestimmte Region des HBsAg-Proteins in der nativen Konformation zwischen den Aminosäuren 120 bis 147 (Schirmbeck und Reimann 2001). Die einmalige intramuskuläre Injektion des Plasmids pCMV-S führt bereits zu einer Antikörperantwort, die nach ca. vier Wochen ein Plateau erreicht und über mehrere Monate erhalten bleibt (Davis et al. 1996). Außerdem enthält HBsAg definierte murine CTL-Epitope, z.B. das dominante L<sup>d</sup>-restriktierte Epitop S<sub>28-39</sub> (Ishikawa et al. 1998), so dass HBsAg ein geeignetes Modellantigen für die Evaluierung von B- und T-Zell-vermittelten Immunantworten in Balb/c-Mäusen ist.

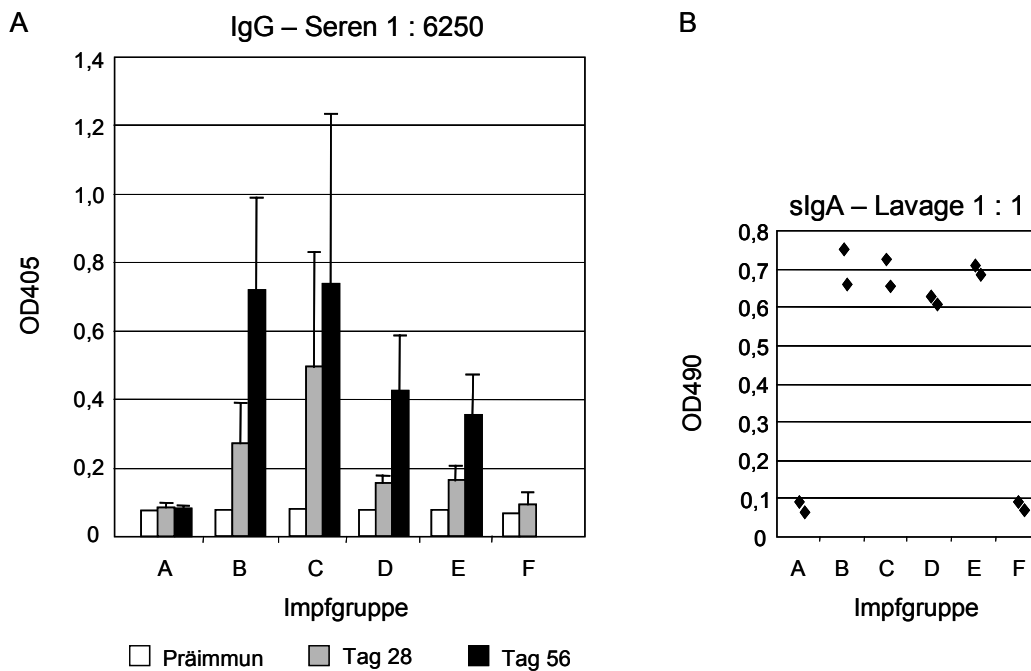
Die Eignung autolytischer Salmonellen als mukosales Vektorsystem für eine HBsAg-DNA-Vakzine wurde schließlich in Mäusen getestet. Für die Immunisierung wurden autolytische Salmonellen verwendet, die die induzierbare Lysedeterminante (entweder Gen-E oder Miniλ) sowie die TmHU-Expressionskassette gemeinsam mit der eukaryontischen HBsAg-Expressionskassette auf einem pUC-abgeleiteten Hochkopienzahlplasmid tragen. Die Konstrukte pHL182 (Gen-E) sowie pHL187a (Miniλ) wurden zunächst vor dem Hintergrund des ZPES-Stammes SL3261::VO330B::YZ220 getestet. Zum Vergleich mit den autolytischen Salmonellen wurde der ZPES-freie Ausgangsstamm SL3261, transformiert mit dem herkömmlichen HBsAg-Expressionsplasmid pCMV-S, in den Versuch einbezogen. Die orale Gabe von PBS sowie die Gabe des plasmidlosen Stammes SL3261 dienten als Negativkontrollen. Als Positivkontrolle wurde eine Impfgruppe einmalig intramuskulär mit reiner Plasmid-DNA immunisiert. Die Impfgruppen sind in Abb. 27A zusammengefasst. Für die orale Gabe wurden die Impfstämme unter anaeroben Bedingungen bei erhöhter Osmolarität (2,5% g/v NaCl) angezogen und den Mäusen  $2 \times 10^8$  Bakterien mittels einer Schlundsonde direkt in den Magen verabreicht. Die orale Immunisierung mit den Salmonellen-Impfstämmen wurde drei Mal entsprechend dem Impfschema wiederholt (Abb. 27B). Streptomycin wurde ca. zwölf Stunden vor jeder oralen Immunisierung direkt in den Magen verabreicht, um so die Kommensalfloora des Darms zu reduzieren und die Invasion des Darmepithels durch die Impfbakterien zu erleichtern (Bohnhoff et al. 1964). Für die Analyse der humoralen Immunantwort wurden Seren kurz vor den jeweiligen Immunisierungen bzw. zwei Wochen nach der letzten Immunisierung gewonnen. Zur Bestimmung mukosaler sekretorischer Antikörper (sIgA) wurden aus dem Dünndarm zwei Wochen nach der letzten Immunisierung die Sekrete von jeweils zwei Tieren einer Gruppe gewonnen.





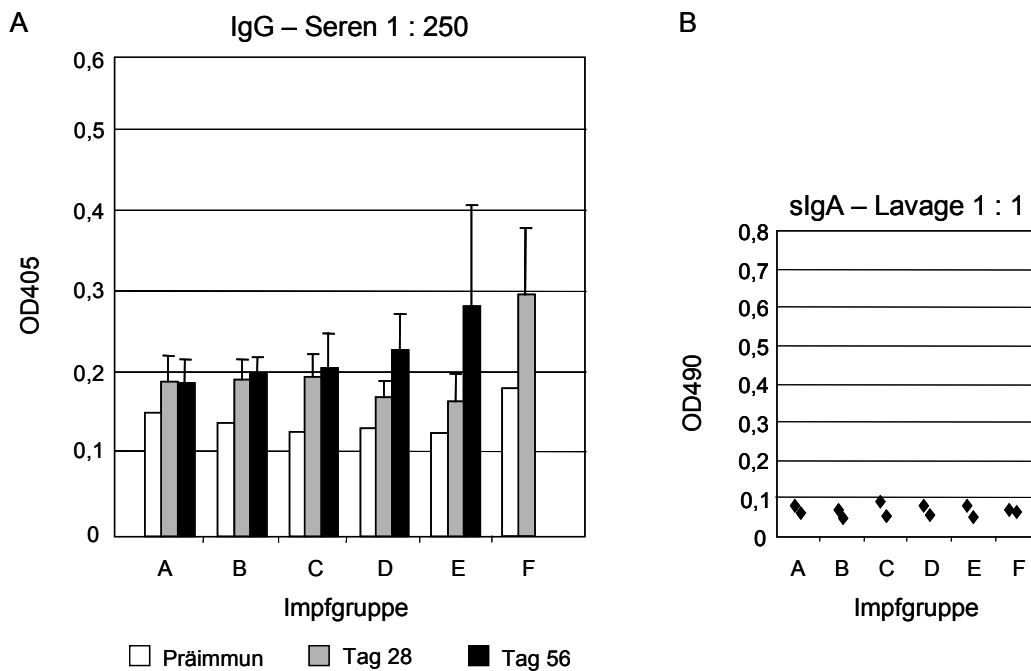
**Abb. 27: Impfgruppen und Impfschema.** A) Gruppeneinteilung für das Immunisierungsexperiment. B) Je Gruppe wurden fünf acht Wochen alte weibliche Tiere des Maus-Inzuchtstammes Balb/c zu den angegebenen Zeitpunkten behandelt. Die Gabe der Salmonellen erfolgte durch intragastrische (i.g.) Inokulation. 12 Stunden vor Gabe der Salmonellen wurde den Tieren 50 mg Streptomycin, gelöst in 0,4 ml Trinkwasser, oral verabreicht. Die Plasmid-DNA wurde beidseitig, jeweils 50 µg, in den *Musculus tibialis anterior* injiziert.

Die Invasivität des Impfstammes ist Voraussetzung für den Salmonellen-vermittelten DNA-Transfer in professionelle APC. Oral verabreichte Bakterien des *aroA*-attenuierten Stammes SL3261 besiedeln die Peyer-Plaques, die mesenterischen Lymphknoten, die Milz sowie die Leber und können dort in begrenztem Umfang replizieren (Maskell et al. 1987). Die Bakterienlast erreicht nach ca. einer Woche ein Maximum, wird dann jedoch durch die einsetzende spezifische Immunantwort zunehmend reduziert. Die Peyer-Plaques von separat immunisierten Tieren wurden nach zwei Tagen gewonnen und das Gewebehomogenat zur Bestimmung des Anteils plasmidhaltiger Salmonellen an der Gesamtbakterienlast auf geeigneten Medienböden plattiert. Bereits zu diesem Zeitpunkt konnten keine plasmidtragenden Salmonellen mehr aus dem Gewebe gewonnen werden. Die Höhe der gegen den Salmonellen-Vektor gerichteten systemischen Antikörperantwort widerspiegelt das Ausmaß der Invasion des Dünndarmepithels durch die Bakterien und ihrer Persistenz im Gewebe. Die Salmonellen-spezifischen Serum-Antikörperantworten, induziert durch den plasmidlosen Impfstamm SL3261 sowie den Impfstamm mit dem herkömmlichen HBsAg-Expressionsplasmid SL3261[pCMV-S], übersteigen deutlich die durch die autolytischen Salmonellen induzierten Antworten (Abb. 28A). Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis auf einen erhöhten Abschwächungsgrad der autolytischen Salmonellen zurückzuführen. Aber auch bei Tieren einer Impfgruppe sind die Schwankungen der systemischen Antikörperantworten beträchtlich. Dies widerspiegelt die inhärente Varianz systemischer Immunantworten zwischen einzelnen Tieren einer Gruppe nach oraler Vakzinierung mit Salmonellen. Dagegen ergab die Analyse der Dünndarmsekrete von jeweils zwei Tieren einer Impfgruppe ähnlich starke Salmonellen-spezifische mukosale Antikörperantworten (Abb. 28B). Für die Induktion einer mukosalen Antikörperantwort ist die Invasivität des Stammes offenbar weniger ausschlaggebend.



**Abb. 28: Salmonellen-spezifische humorale Immunantwort.** A) Für die Analyse der Serum-IgG-Antworten wurden zu den bezeichneten Zeitpunkten Seren einzelner Tiere gewonnen und in der Verdünnung 1 : 6250 im ELISA eingesetzt. Aus den Absorptionswerten der Einzeleren wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der jeweiligen Impfgruppe berechnet. B) Die Dünndarm-Lavage von jeweils zwei Tieren einer Gruppe wurde in einer Verdünnung von 1 : 1 zur Bestimmung Salmonellen-spezifischer mukosaler Antikörper im ELISA eingesetzt.

Die Induktion deutlicher HBsAg-spezifischer humoraler Immunantworten wurde lediglich in einigen Tieren nach der dreimaligen oralen Immunisierung mit dem autolytischen Impfstamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] erreicht, die in der Größenordnung der durch die herkömmliche intramuskuläre DNA-Vakzinierung induzierten Antworten lag (Abb. 29A). Die induzierten Antikörperantworten in den Tieren der Gruppen, immunisiert mit dem nicht-lytischen Stamm SL3261[pCMV-S] sowie dem autolytischen Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL182], waren nach drei oralen Immunisierungen im direkten Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppen (PBS oder SL3261[-]) geringfügig erhöht. In den Dünndarmsekreten keiner Gruppe wurden HBsAg-spezifische mukosale Antikörper detektiert (Abb. 29B).

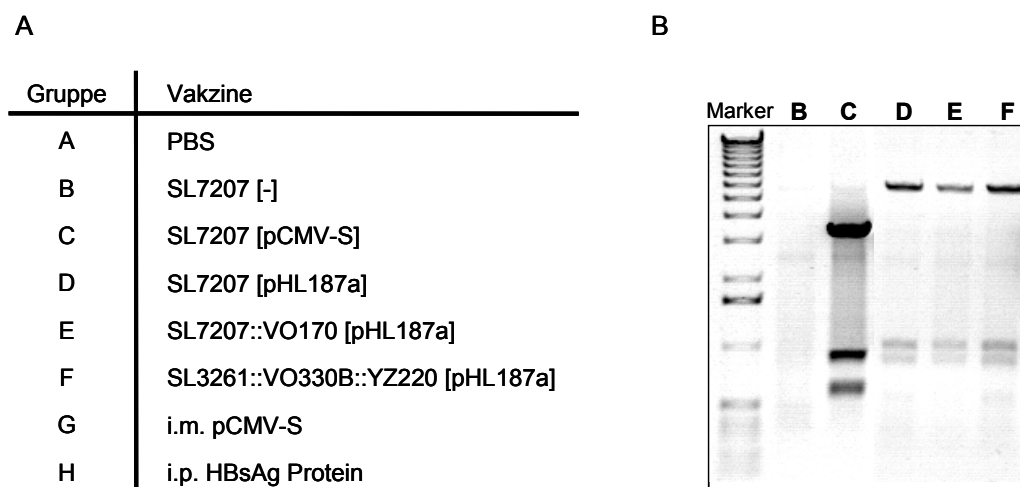


**Abb. 29: HBsAg-spezifische humorale Immunantwort.** A) Für die Analyse der Serum-IgG-Antworten wurden zu den bezeichneten Zeitpunkten Seren einzelner Tiere gewonnen und in der Verdünnung 1 : 250 im ELISA eingesetzt. Aus den Absorptionswerten der Einzelseren wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der jeweiligen Impfgruppe berechnet. B) Die Dünndarm-Lavage von jeweils zwei Tieren einer Gruppe wurde in einer Verdünnung von 1 : 1 zur Bestimmung HBsAg-spezifischer mukosaler Antikörper im ELISA eingesetzt.

### 6.5.2 Vergleich verschiedener Impfstämme

Der *aroA*-attenuierte Impfstamm SL7207 wurde auf gleiche Weise wie SL3261 erzeugt (Hoiseth und Stocker 1981), ist jedoch in der Maus geringfügig virulenter als SL3261. Als Träger des herkömmlichen HBsAg-Expressionsplasmids pCMV-S wurde mit diesem Stamm nach der oralen Gabe bereits die Induktion einer spezifischen CTL-Antwort demonstriert (Woo et al. 2001). Dieser Stamm wurde hier in der oralen Immunisierung mit den autolytischen Salmonellen hinsichtlich der Induktion einer HBsAg-spezifischen humoralen Immunantwort sowie einer CTL-Antwort verglichen. Für die autolytischen Stämme wurde das optimierte Ein-Plasmid-Konstrukt pHL187a mit der Miniλ-Lysedeterminante sowie der TmHU-Expressionskassette ausgewählt. Das ZPES des Stammes SL3261::VO170 wurde in den SL7207-Hintergrund übertragen, da es sich leicht Tn7-vermittelt in eine definierte Stelle des bakteriellen Chromosoms integrieren lässt (siehe Abschnitt 2.1.1), im Gegensatz zu dem ZPES des Stammes SL3261::VO330B::YZ220. Die chromosomale Inversion des variablen Fragmentes des Stammes SL3261::VO170 erfolgt in ca. 3% der Bakterien einer Generation. Da die ZPES-vermittelte Antigenexpression vor dem Hintergrund des Stammes SL3261::VO170 in einem anderen Modell bereits zur Induktion antigenspezifischer Immunantworten geführt hatte (persönliche Mitteilung von V. Spehr), erschien das ZPES dieses Stammes für einen autolytischen Salmonellen-DNA-Vektor als geeignet. Der neukonstruierte autolytische Stamm SL7207::VO170[HL187a] wurde schließlich mit den nicht-lytischen Stämmen SL7207[pCMV-S]

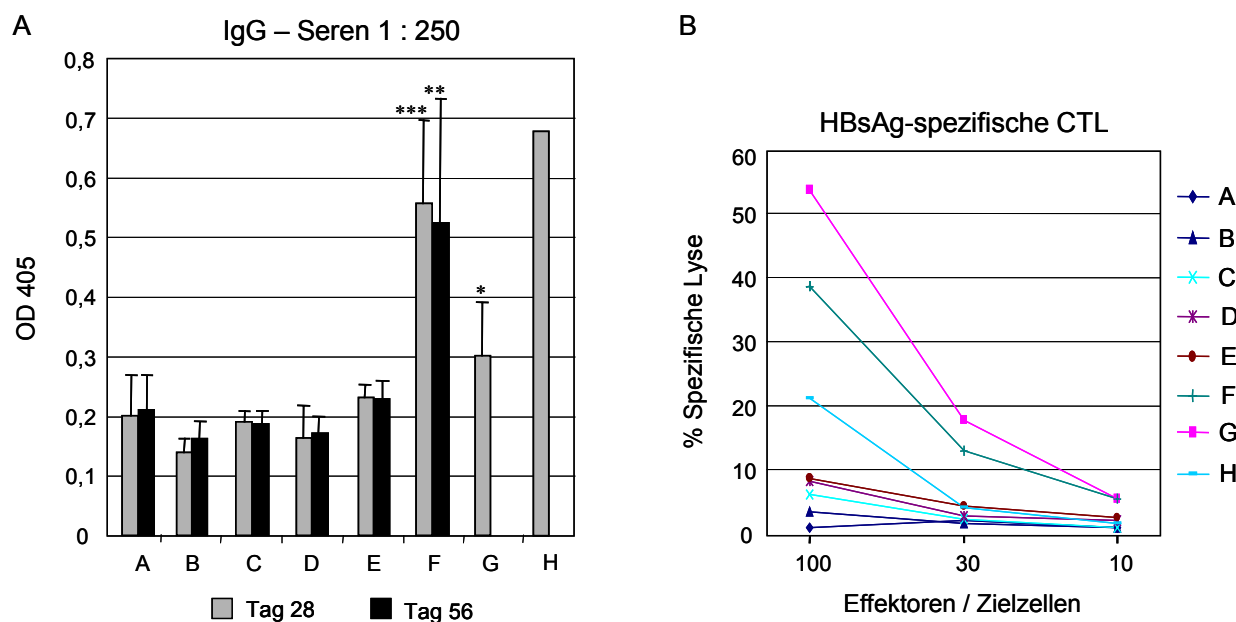
und SL7207[pHL187a] sowie dem bereits verwendeten autolytischen Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] in der oralen Immunisierung verglichen. Die Gruppeneinteilung für diesen Versuch ist in Abb. 30A dargestellt. Die Immunisierung erfolgte nach gleichem Schema, wie zuvor im Abschnitt 4.5.1. beschrieben. Die intraperitoneale Injektion des aufgereinigten rekombinanten Proteins wurde als weitere Positivkontrolle in das Experiment einbezogen. In geringer Menge und ohne Adjuvanz induziert das über diese Route injizierte Protein neben einer Antikörperantwort auch eine moderate CTL-Antwort (Schirmbeck et al. 1994). Dies ist für eine Proteinimmunisierung ungewöhnlich und lässt sich auf den partikulären Charakter von HBsAg zurückführen. Die orale Gabe von PBS sowie die Gabe des plasmidlosen Stammes SL7207 dienten wiederum als Negativkontrollen. Anhand der Menge isolierter Plasmid-DNA aus dem oralen Inokulum des jeweiligen Impfstammes wird ersichtlich, dass das Plasmid pHL187a durch die Salmonellen in deutlich geringerer Kopienzahl propagiert wird als der Ausgangsvektor pCMV-S (Abb. 30B). Ursache dafür ist wahrscheinlich die belastende Wirkung der plasmidkodierten Miniλ-Lysedeterminante. Die Menge an Plasmid-DNA einer oralen Dosis des Stammes SL7207[pCMV-S] betrug ca. 1 µg, während die DNA-Menge der Stämme mit dem Ein-Plasmid-Konstrukt pHL187a um ca. eine Größenordnung darunter lag. Im Gegensatz dazu überstieg die Menge intramuskulär injizierter Plasmid-DNA um zwei bzw. drei Größenordnungen die oral applizierte Plasmid-DNA-Menge.



**Abb. 30: Impfgruppen und Plasmid-DNA-Gehalt der Impfstämme.** A) Gruppeneinteilung für das Immunisierungsexperiment. B) Isolation der Plasmid-DNA aus dem jeweiligen oralen Impfinokulum. Plasmid-DNA wurde aus der Impfkultur isoliert und der einer Impfdosis ( $2 \times 10^8$  Bakterien) entsprechende Teil des Isolats mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut sowie gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die nicht-lytischen Impfstämme sowie der auf SL7207::VO170 basierende autolytische Impfstamm verfehlten die Induktion einer HBsAg-spezifischen Antikörperantwort. Nur der Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] stimulierte in diesem Experiment bereits nach der ersten oralen Gabe eine signifikante Antikörperantwort. Diese war vergleichbar mit der Antwort in intraperitoneal proteinimmunisierten Tieren und übertraf die Antwort der mit der herkömmlichen intramuskulären DNA-Vakzine immunisierten Tiere (Abb. 31A).

Wiederholungsimpfungen mit dem Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] führten zu keiner weiteren Steigerung der HBsAg-spezifischen Antikörperantwort. Für die Analyse der HBsAg-spezifischen CTL-Antworten wurden von jeweils zwei Tieren vereinte, *in vitro* restimulierte Milzzellen in einem klassischen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay gegen stabil HBsAg-transfizierte P815-Zielzellen eingesetzt (Schirmbeck et al. 1994). Die höchste HBsAg-spezifische CTL-Antwort wurde durch die intramuskuläre DNA-Injektion stimuliert, gefolgt von der oralen DNA-Vakzinierung mit dem Impfstamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] sowie dem intraperitoneal injizierten Protein. Die anderen Salmonellen-Impfstämme verfehlten dagegen die Stimulation von HBsAg-spezifischen CTL-Antworten (Abb. 31B).



**Abb. 31: HBsAg-spezifische Antikörperantwort und CTL-Antwort.** A) HBsAg-spezifischen Serum-IgG-Antworten. Seren einzelner Tiere bzw. ein Serumpool der proteinimmunisierten Tiere wurden in der Verdünnung 1 : 250 im ELISA eingesetzt. Aus den Absorptionswerten der Einzelseren wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der jeweiligen Impfgruppe berechnet. Die Signifikanz der erhöhten Absorptionswerte bezüglich der Gruppe A wurde mit dem ungepaarten Student-t-Test ermittelt : (\*)  $P = 0,029$ ; (\*\*)  $P = 0,0059$ ; (\*\*\*)  $P = 0,00041$ . B) CTL-Antwort. Milzzellen von zwei Tieren der jeweiligen Impfgruppe wurden vermischt und sechs Tage *in vitro* restimuliert. Die resultierenden Effektorzellen wurden in einem klassischen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay gegen die stabil HBsAg-transfizierten,  $^{51}\text{Cr}$ -gepulsten Zielzellen P815-S in den angegebenen Verhältnissen eingesetzt und anhand der Menge freigesetzter Radioaktivität die spezifische Lyse berechnet. Der parallele Einsatz nicht-transfizierter P815-Zellen als Zielzellen lieferte keine spezifische Lyse.

Der direkte Vergleich verschiedener Salmonellen-Stämme als Träger des Ein-Plasmid-Konstruktes pHL187a zeigt, dass der ZPES-Stamm SL3261::VO330B::YZ220 am besten für den Transfer der DNA-Vakzine geeignet ist. Dieser Stamm vermittelt aufgrund der höheren Expressionsfrequenz der Lysedeterminante Mini $\lambda$  eine effizientere bakterielle Autolyse als der Stamm SL7207::VO170. Hervorzuheben ist, dass die orale autolytische Salmonellen-DNA-Vakzine SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] schon nach einer einmaligen Gabe eine effiziente

humorale und zelluläre Immunantwort induziert, obwohl bedeutend weniger Plasmid-DNA als bei der herkömmlichen intramuskulären DNA-Injektion verabreicht wird.

## 7 Diskussion

Die Entwicklung neuartiger Impfstoffe und Immuntherapien nimmt eine zentrale Stellung in der modernen medizinischen Forschung ein. Die genetische Vakzinierung hat die Impfstoffentwicklung des letzten Jahrzehnts entscheidend beeinflusst und neue Strategien für die Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten und Krebs initiiert. Die muskuläre Injektion von Plasmid-DNA oder der intradermale Beschuss mit DNA-ummantelten Mikropartikeln haben in Tiermodellen protektive humorale und zelluläre Immunantworten gegen eine Reihe verschiedener Antigene induziert (Donnelly et al. 1998). In ersten klinischen Studien blieb jedoch die Potenz der applizierten DNA-Vakzine hinter den Erwartungen zurück (MacGregor et al. 1998; Roy et al. 2000). Die Ausweitung des Konzepts der genetischen Vakzinierung zur Prävention mukosaler Infektionen, insbesondere der HIV-Infektion, erfordert die Entwicklung neuer mukosaler Impfstoffträgersysteme (van Ginkel et al. 2000; Berzofsky et al. 2001). Vielversprechend ist dabei die Verwendung rekombinanter attenuierter Bakterien als DNA-Vektorsysteme, da sie gezielt die APC des mukosaassoziierten Lymphgewebes infizieren und eine DNA-Vakzine transferieren können (Sizemore et al. 1995; Paglia et al. 1998; Weiss und Krusch 2001). Seit längerem ist bekannt, dass einige Bakterien fremde DNA in Zellen höherer Organismen einschleusen können. Beispielsweise überträgt *Agrobacterium tumefaciens* ein DNA-Fragment von außen in Pflanzenzellen und greift dadurch gezielt in den Zellmetabolismus ein (Lessl und Lanka 1994). Dieser natürliche Vorgang wird inzwischen bei der Herstellung rekombinanter Pflanzen routinemäßig ausgenutzt. Zwischen *E.coli* und Hefezellen wurde ein konjugativer DNA-Transfer beobachtet (Heinemann und Sprague, Jr. 1989). Die orale Gabe filamentöser Phagenpartikel führt zur Aufnahme der Phagen-DNA in verschiedene Zellen und Gewebe der Maus (Schubbert et al. 1997). Da kommensale Bakterien Phagen propagieren können (Levy und Marshall 1981), besteht die Möglichkeit des Transfers von Phagen-DNA freigesetzt durch Bakterien der Darmflora in eukaryontische Zellen. Die direkte Übertragung von Plasmid-DNA aus Bakterien in das Zytoplasma eukaryontischer Zellen wurde durch Inkubation von *E.coli* mit verschiedenen Säugerzellen erreicht (Schaffner 1980). Die Frequenz dieser DNA-Übertragung ist sehr niedrig, konnte jedoch durch Kopräzipitation der Bakterien mit Kalziumphosphat oder Vorbehandlung mit Lysozym erhöht werden. Erst vor kurzem wurde erkannt, dass invasive intrazelluläre Bakterien, z.B. Shigellen, *E.coli*, Salmonellen, Listerien oder Yersinien, Plasmid-DNA in eukaryontische Wirtszellen transferieren können (Sizemore et al. 1995; Courvalin et al. 1995; Darji et al. 1997).

In dieser Arbeit wurden attenuierte Salmonellen schrittweise als Plasmid-DNA-Vektoren für die orale genetische Vakzinierung optimiert. Als Ausgangspunkt dienten die *aroA*-attenuierten *S.enterica* Typhimurium-Impfstämme SL3261 und SL7207, transformiert mit herkömmlichen eukaryontischen Expressionsplasmiden. Diese Plasmide sind pUC-abgeleitete Hochkopienzahlplasmide und werden in Abhängigkeit ihrer Komplexität in einer Zahl bis zu 700 Molekülen je Bakterium propagiert (Yanisch-Perron et al. 1985). Bereits bekannt war, dass Hochkopienzahlplasmide ohne selektiven Druck durch Antibiotika in der bakteriellen Kultur schnell verloren gehen, währenddem das Niedrigkopienzahlplasmid pBR322 ohne selektiven

Druck in der Kultur und *in vivo* von Salmonellen stabil propagiert wird (Coulson et al. 1994). Die Erhaltung der pUC-abgeleiteten Plasmide belastet den Stoffwechsel der Bakterien und verringert ihre Invasivität *in vivo*. Der direkte Vergleich in der Kultur von Salmonellen, transformiert mit verschiedenen Plasmiden, bestätigte das Ergebnis von Coulson et al. Neben dem pBR322-abgeleiteten Plasmid pET11a wurde auch das Niedrigkopienzahlplasmid pACYC177 mit dem p15A-Replikationsursprung ohne selektiven Druck stabil propagiert. Dagegen gingen die eukaryontischen Expressionsplasmide pcDNA3 (ohne Antigen) und pCMV-S (HBsAg-Expressionsplasmid) sowie der pUC19-Vektor innerhalb weniger Stunden ohne Selektion verloren. Die Größe und Komplexität der Plasmide pcDNA3 und pCMV-S führte im Vergleich mit pUC19 zu einer verringerten Kopienzahl je Bakterium, die jedoch noch mehr als eine Größenordnung über der Molekülzahl der Plasmide pET11a und pACYC177 lag. Obwohl der CMV-Promotor/Enhancer in Bakterien eine minimale Hintergrundexpression vermittelt (Davis und Huang 1988), beeinträchtigt die HBsAg-Expressionskassette offenbar nicht die Plasmidstabilität, wahrscheinlich weil die Expression des kompletten kleinen HBsAg-Proteins (S-Domäne) aufgrund hydrophober Transmembrandomainen in Salmonellen nicht möglich ist (Sheu und Lo 1995).

Mit einer oralen Salmonellen-DNA-Vakzine wurde erstmalig von Darji et al. in Mäusen die Induktion überzeugender humoraler und zellulärer Immunantworten demonstriert (Darji et al. 1997). Da die verwendeten pUC-abgeleiteten Antigenexpressionsplasmide durch den *aroA*-attenuierten Impfstamm SL7207 ohne den selektiven Druck *in vivo* nicht stabil propagiert werden, ist zu vermuten, dass der DNA-Transfer aus den Bakterien innerhalb weniger Stunden nach der oralen Gabe in die Zellen des darmassoziierten lymphoiden Gewebes erfolgt. Zu diesem Zeitpunkt sollte also der Transfer einer maximalen DNA-Dosis erfolgen, um eine hohe Vakzineeffizienz zu erreichen. Eine andauernde Persistenz plasmidtragender Salmonellen ist dagegen möglicherweise unnötig. In der Tat wurde bereits acht Stunden nach Gabe der oralen Vakzine eine antigenspezifische, zelluläre Immunaktivierung in den Peyer-Plaques, mesenterischen Lymphknoten und der Milz detektiert (Darji et al. 2000). Aus Studien mit rekombinanten Salmonellen zur Expression heterologer Antigene ist bekannt, dass eine instabile, plasmidkodierte Antigenexpressionskassette in der Induktion systemischer und mukosaler Antikörperantworten einer stabilen, chromosomal integrierten Kassette überlegen ist (Cardenas und Clements 1993). Eine neuere Studie zeigt, dass die Aktivierung von Salmonellen-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen schon wenige Stunden nach Infektionsbeginn in den Peyer-Plaques und mesenterischen Lymphknoten erfolgt, wofür wahrscheinlich die direkte lokale Antigenpräsentation durch DC ausschlaggebend ist (McSorley et al. 2002). Eine ähnlich frühe Aktivierung und Widmung der pathogen-spezifischen T-Zellen wurde ebenfalls während der Infektion mit *Listeria monocytogenes* beobachtet. Hier erfolgt die Induktion der zellulären Immunantwort während des ersten Tages der Infektion und bleibt später unbeeinflusst von dem weiteren Verlauf der bakteriellen Infektion (Mercado et al. 2000). Ein optimaler Salmonellen-DNA-Vakzinevektor sollte also möglichst während der frühen Infektionsphase eine hohe Dosis Plasmid-DNA in professionelle APC freisetzen, insbesondere in DC. Aus diesem Grunde wurde trotz dessen Instabilität das herkömmliche pUC-abgeleitete, eukaryontische HBsAg-



Expressionplasmid pCMV-S als Basis für die Konstruktion neuer Plasmidvektoren für einen autolytischen Salmonellen-DNA-Vektor beibehalten.

In Ampicillin-haltigem Medium kultivierte Salmonellen haben in der stationären Wachstumsphase bereits teilweise das pUC-abgeleitete eukaryontische Expressionplasmid verloren. Bei einer höheren Kulturdichte wird wahrscheinlich  $\beta$ -Laktamase verstärkt aus dem bakteriellen Periplasma freigesetzt und dadurch das Ampicillin im Medium abgebaut. Der Plasmidverlust tritt nicht ein, wenn die Plasmidselektion mit Kanamycin erfolgt. Das pUC-abgeleitete GFP-Reporterplasmid pEGFP-C1 trägt das Kanamycin-Resistenzgen. Außerdem besitzt dieses Plasmid den Replikationsursprung des SV40-Virus, so dass sich das Plasmid in COS7-Zellen, vermittelt durch das in diesen Zellen konstitutiv exprimierte SV40-T-Antigen, im Nukleus replizieren und somit stark vermehren kann (Mellon et al. 1981). Der Transfer einzelner Plasmide ist deshalb ausreichend, um eine starke Reportergenexpression zu induzieren. Da COS7-Zellen auch relativ robust gegenüber einer Salmonellen-Infektion sind, dienten diese Zellen vorrangig zur *in vitro*-Analyse des Infektionsverlaufs plasmidtragender Salmonellen sowie der Untersuchung des DNA-Transfers aus den Bakterien in die Wirtszelle. Die Infektionseffizienz plasmidtragender Bakterien liegt deutlich unter der des plasmidlosen Stammes. Die Erhaltung des Hochkopienzahlplasmids führt also zu einer zusätzlichen Attenuierung des Impfstammes *in vitro*. Dieser Effekt ist bereits aus dem Tierversuch bekannt (Coulson et al. 1994). Die Auswahl eines invasiveren Ausgangsstammes könnte die plasmidvermittelte Attenuierung ausgleichen und den DNA-Transfer in das Gewebe steigern. Denkbar wäre auch, die Plasmidreplikation während der Infektionsphase zu drosseln und erst nach der Invasion zu erhöhen. In einem solchen System könnte ein *in vivo*-induzierbarer Promotor die Synthese unbeladener tRNA-Moleküle im infizierten Gewebe anschalten, so dass eine drastische Erhöhung der ColEI-vermittelten Plasmidreplikation einsetzt (Wrobel und Wegrzyn 1998). Fraglich ist allerdings, ob die Bakterien im infizierten Gewebe zu einer starken DNA-Syntheseleistung überhaupt fähig sind. Um den bakteriellen Stoffwechsel gänzlich zu entlasten, könnte die Amplifizierung der Transgen-kodierenden genetischen Information auch in das Zytoplasma der infizierten Wirtszelle verlagert werden. Hierbei bietet sich für eine Salmonellen-DNA-Vakzine die Verwendung eines alphaviralen Replikons an (Tubulekas et al. 1997). Das rekombinante Replikon würde unter die transkriptionelle Kontrolle des CMV-Promotors auf ein Niedrigkopienzahlplasmid gesetzt werden, so dass der bakterielle DNA-Vektor durch die Plasmiderhaltung selbst wenig beeinträchtigt wird. In der infizierten Wirtszelle wäre der Transfer weniger Plasmidmoleküle in den Nukleus ausreichend, um sich selbst amplifizierende RNA-Moleküle zu synthetisieren. Die im Zytoplasma akkumulierende virale RNA vermittelt in der Folge einerseits eine starke Transgenexpression, andererseits werden antivirale Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems sowie die Apoptose der Zellen induziert (Barber 2001).

Die *aroA*-attenuierten Impfstämme SL3261 sowie SL7207, transformiert mit dem pEGFP-C1-Vektor, verfehlten die Induktion einer Reportergenexpression in COS7-Zellen sowie in Maus-Makrophagen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Grillot-Courvalin et al. (Grillot-

Courvalin et al. 2002). Der Verbleib durch Salmonellen in die infizierte Wirtszelle eingeschleuster Plasmidmoleküle wurde in COS7-Zellen untersucht. Unmittelbar nach der Zellinvasion tragen noch alle Bakterien das Plasmid, im weiteren Infektionsverlauf kommt es jedoch zur präferentiellen Proliferation plasmidfreier Bakterien, wahrscheinlich weil sie nicht durch die Plasmiderhaltung in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigt sind. Die geringfügige Zunahme der Plasmidmolekülzahl in den infizierten Zellen nach zwölf Stunden zeigt jedoch, dass zumindest in geringem Umfang die Plasmidreplikation in den plasmidtragenden intrazellulären Bakterien fortwährt. Die Zugabe von Penicillin/Streptomycin zu diesem Zeitpunkt in das Kulturmedium infizierter Zellen führte zum Wachstumsstopp intrazellulärer Bakterien, jedoch nicht zu einer effektiven Abtötung der Bakterien. Trotz der Wachstumsunterbrechung sank die Gesamtzahl der Plasmide kontinuierlich weiter, so dass nach 24 Stunden nur noch wenige Moleküle im Lysat infizierter Zellen nachweisbar waren. Auch die Behandlung mit weiteren Antibiotika war nicht geeignet, intrazelluläre Bakterien effektiv zu lysieren und den DNA-Transfer in den Zellkern auszulösen.

Dem Transfer der Plasmid-DNA aus den Salmonellen in den Nukleus der Wirtszelle stehen neben der bakteriellen Zellwand weitere Barrieren innerhalb der Wirtszelle entgegen. Die Verpackung von Plasmiden als Phagenpartikel durch intrazelluläre Salmonellen erschien als eine geeignete Strategie, Plasmide aus den Bakterien auszuschleusen und weiter aus dem Phagosom, vor Nukleasen geschützt, in den Zellkern zu befördern. Auf der Grundlage mehrerer Vorarbeiten erschien die Entwicklung eines solchen Systems möglich. Die Infektion einer *E.coli*-Kultur mit dem Helferphagen M13KO7 führt zu der präferentiellen Verpackung des propagierten Phagemids, einem Plasmid mit dem Verpackungs- und Replikationsursprung eines filamentösen Wildtypphagen (Vieira und Messing 1987). Mehrere hundert Phagenpartikel werden während einer Generation sekretiert, ohne jedoch die Bakterien zu lysieren. Als Phagenpartikel verpackte eukaryontische Expressionsplasmide können aus dem Kulturüberstand einer *E.coli*-Kultur gewonnen und für die Transfektion von Säugerzellen verwendet werden (Yokoyama-Kobayashi und Kato 1993). Das Adsorptionsprotein gIII und das Hauptkapsidprotein gVIII tolerieren die Fusion mit fremden Proteindomänen, die dadurch auf der Oberfläche der Phagenpartikel zugänglich werden. Diese Entdeckung hat zu der Entwicklung der Phage-Display-Technik geführt, mit der eine große Anzahl von unterschiedlichen Liganden auf der Phagenoberfläche dargestellt und selektiert werden können (Smith 1985). Die Auswahl bestimmter Liganden, z.B. für Oberflächenrezeptoren eukaryontischer Zellen, ermöglicht einen gezielten Phagen-vermittelten Gentransfer (Larocca et al. 1999). Die Phagenhülle könnte so mit Liganden ausgestattet werden, die einen verbesserten intrazellulären DNA-Transfer aus dem Phagosom, durch das Zytoplasma in den Zellkern vermitteln. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass Salmonellen zwar prinzipiell filamentöse Phagen propagieren und eukaryontische Expressionplasmide als Phagenpartikel verpacken können, aber die Sekretion kotransformierter Phagemide weit hinter der Verpackung des Helferphagen zurückbleibt. Die Konstruktion eines Helferphagen ohne eigenes Verpackungssignal könnte zu einer präferentiellen Phagemidverpackung durch Salmonellen führen. Wahrscheinlich ist jedoch die Belastung des bakteriellen Stoffwechsels durch die

Phagensekretion zu groß, um tatsächlich eine große Partikelzahl in der infizierten Wirtszelle freizusetzen.

Die Bedeutung der bakteriellen Lyse für den Transfer der Plasmid-DNA in den Zellkern infizierter Wirtszellen wurde anhand der erfolgreichen Verwendung eines *asd*-attenuierten *Shigella flexneri*-Stammes als DNA-Vektor deutlich (Sizemore et al. 1995). Das *asd*-Gen kodiert für die Aspartat- $\beta$ -Semialdehyddehydrogenase und ist in gramnegativen Bakterien hochkonserviert. Dieses Enzym ist an der Synthese eines essentiellen Substrats für die Peptidoglykanvernetzung, der Diaminopimelischen Säure (DAP), beteiligt. Der DAP-Mangels in der eukaryontischen Wirtszelle führt zu einer Störung der bakteriellen Zellwandbildung, so dass *asd*-attenuierte Shigellen im Zytoplasma der Wirtszelle lysieren. Mit diesem Stamm wurde *in vitro* und *in vivo* ein effizienter DNA-Transfer demonstriert (Sizemore et al. 1995; Sizemore et al. 1997). Ähnlich zu Shigellen vermehrt sich auch *Listeria monocytogenes* im Zytoplasma der Wirtszelle. In der Zellkultur können Antibiotika die Lyse intrazellulärer Listerien induzieren und dadurch den DNA-Transfer verbessern (Hense et al. 2001). Eine weitere Steigerung des Listerien-vermittelten DNA-Transfers wurde in der Zellkultur durch die Konstruktion eines induzierbaren bakteriellen Suizidsystems erreicht (Dietrich et al. 1998). Dazu wurde das Lysegen des Bakteriophagen A118 unter Kontrolle des intrazellulär induzierten *actA*-Promotors gebracht, so dass bei Eintritt der Bakterien in das Wirtszellzytoplasma die bakterielle Lyse ausgelöst wird. Die Konstruktion eines lytischen bakteriellen Vektors ist also eine erfolgversprechende Strategie zur Optimierung des Bakterien-vermittelten DNA-Transfers. Im Gegensatz zu Shigellen oder Listerien proliferieren Salmonellen in der Wirtszelle in einem adaptierten Phagosom (Garcia-del Portillo und Finlay 1995). Während *asd*-attenuierte Shigellen den DNA-Transfer vermitteln, konnte keine Transgenexpression mit dem plasmidtragenden *asd*-attenuierten *S. enterica* Typhimurium-Stamm  $\chi$ 4072 in der Zellkultur induziert werden. Die phagosomale Membran verhindert offenbar die Freisetzung der Plasmid-DNA aus lysierenden Salmonellen in das Zytoplasma. Anders als der *asd*-attenuierte Stamm persistieren die *aroA*-attenuierten Stämme SL3261 und SL7207 nach oraler Gabe in Mäusen mehrere Wochen in den Peyer-Plaques, den mesenterischen Lymphknoten, der Milz sowie der Leber und werden erst durch die Salmonellen-spezifische Immunantwort beseitigt (Maskell et al. 1987; Raupach und Kaufmann 2001). Die dauerhafte Integrität der Bakterien dieser Stämme erschwert also die frühe Freisetzung der Plasmid-DNA im infizierten Gewebe.

Die Entwicklung eines induzierbaren Suizidsystems für einen Salmonellen-DNA-Vektor stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Für ein solches Suizidsystem wird eine Lysedeterminante benötigt, die in der infizierten Wirtszelle, in Abhängigkeit zeitlicher oder örtlicher Signale, die bakterielle Zellwand zerstört. Bakteriophagen, mit Ausnahme der filamentösen Phagen, verfügen über strikt regulierte Lysesysteme, die nach Abschluss der Phagenvermehrung die bakterielle Hülle degradieren, so dass Phagenpartikel aus dem Zellinneren in das umgebende Medium freigesetzt werden. Zwei grundlegend verschiedene Lysestrategien sind in der Evolution von Phagen entstanden (Young et al. 2000). Alle Doppelstrang-DNA-Phagen lysieren die bakterielle Zelle durch die konzertierte Aktion eines kleinen, porenformierenden Membranproteins, dem

Holin, und einer löslichen Peptidoglykanhydrolase, dem Endolysin. Das Lyseoperon des Phagen  $\lambda$  ist ein gut untersuchtes Beispiel dieser Lysestrategie (Young 1992; Grundling et al. 2000). Einzelstrang-DNA- und RNA-Phagen dagegen induzieren die bakterielle Lyse mittels eines einzelnen kleinen Proteins. Das Lyseprotein E des Phagen  $\phi$ X174 blockiert die Translokase MraY, einem an der Peptidoglykansynthese beteiligten Enzyms, so dass die bakterielle Zellwand destabilisiert wird und schließlich zerreißt (Bernhardt et al. 2000). Zunächst wurde Protein-E als Lysedeterminante für das neuartige Salmonellen-Suizidsystem favorisiert. Die Etablierung eines gewebeinduzierten Lysesystems auf der Basis der *in vivo*-induzierten Promotoren des *nirB*-Gens aus *E.coli* (Chatfield et al. 1992) oder des *ssaH*-Gens aus *S.enterica* Typhimurium (Valdivia und Falkow 1997) scheiterte vermutlich aufgrund der Hintergrundaktivität beider Elemente in der Kultur. Ein solches *in vivo*-induzierbares Suizidsystem wäre geeignet, um nach der oralen Verabreichung der Salmonellen-DNA-Vakzine, die Lyse aller Bakterien sehr schnell nach der Invasion des darmassoziierten Lymphgewebes zu erreichen. Eine hohe Transgenexpression zu diesem Zeitpunkt, begleitet durch Adjuvanzwirkung der bakteriellen Infektion, würde möglicherweise effektiv mukosale T-Zellen stimulieren (McSorley et al. 2002). Die Identifizierung dicht regulierter, *in vivo*-induzierter Promotoren in Salmonellen, ähnlich dem *actA*-Promotor von *Listeria monocytogenes* (Dietrich et al. 1998), oder die Verwendung weniger toxischer Lysedeterminanten, z.B. bakterieller Autolysine (Lewis 2000), führen möglicherweise in der Zukunft zur Konstruktion eines derartigen Systems.

Alternativ zu einem *in vivo*-induzierbaren Promotor wurde für die Konstruktion des autolytischen Salmonellen-DNA-Vektorsystems in dieser Arbeit ein neuartiges Expressionssystem für toxische Antigene in Salmonellen verwendet, das ZPES (Yan und Meyer 1996). Dieser molekulare Schalter ermöglicht die spontane Induktion der T7RNAP-vermittelten Expression hochtoxischer Proteine in einem Teil der bakteriellen Gesamtpopulation. Die Höhe dieses Anteils richtet sich nach dem Expressionsniveau der Invertase Gin, die die Inversion des chromosomalen Fragmentes mit der T7RNA-Polymerase katalysiert. Zwei ZPES-Systeme mit unterschiedlicher Phasenvariationsfrequenz wurden als Basis für die autolytischen Salmonellen verwendet. Der Stamm SL3261::VO330B::YZ220 vermittelt in der Kultur eine Inversionsrate von ca. 20% je Generation, besteht jedoch aus zwei chromosomalen Kassetten, von denen sich eine Tn5-vermittelt nur undefiniert in weitere Stämme transferieren lässt. Die Inversionsrate des ZPES-Stammes SL3261::VO170 liegt ca. zehnfach unter der des Stammes SL3261::VO330B::YZ220, wurde jedoch bereits erfolgreich zur phasenvariablen Antigenexpression in der Immunisierung eingesetzt (persönliche Mitteilung von V. Spehr). Vorteilhaft ist, dass sich dieses ZPES Tn7-vermittelt in den gleichen chromosomalen Lokus beliebiger gramnegativer Bakterien übertragen lässt. Für die Konstruktion eines lytischen DNA-Vektors ist jedoch eine hohe Inversionsrate und damit ein hohes T7RNAP-vermitteltes Expressionsniveau der Lysedeterminante wünschenswert, um Plasmid-DNA aus möglichst vielen Bakterien freizusetzen. Zur Steigerung der Lysefrequenz plasmidtragender Salmonellen in dem infizierten Gewebe ist die Kombination eines *in vivo*-induzierbaren Promotors mit dem ZPES vielversprechend. Dieser Promotor könnte die Expression der Invertase Gin gezielt im Gewebe erhöhen und somit eine höhere Lysefrequenz *in vivo* erzeugen. In dieser Arbeit wurde das ZPES des Stammes SL3261::VO170

in den Stamm SL7207 gebracht, um einen autolytischen Vektor vor dem Hintergrund des in der oralen DNA-Vakzinierung erfolgreich getesteten Stammes zu erzeugen.

Die ZPES-vermittelte, spontan induzierte Expression von Protein-E führt zur Autolyse eines Teils der Bakterien in der wachsenden Kultur. Während der Lyse wird bakterieller Zellinhalt in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt, einschließlich Plasmid-DNA sowie Proteine unterschiedlicher Größe. Es besteht also die Möglichkeit, neben der Plasmid-DNA auch koexprimierte, den DNA-Transfer potentiell unterstützende Komponenten freizusetzen. Aus dem Vergleich *asd*-attenuierter Shigellen und Salmonellen wird deutlich, dass die Freisetzung von Plasmid-DNA aus dem Phagosom für den Salmonellen-vermittelten DNA-Transfer eine weitere entscheidende Voraussetzung darstellt. Die Sekretion von LLO führt *in vitro* zu einer Verbesserung des Salmonellen-vermittelten DNA-Transfers (Catic et al. 1999; Grillot-Courvalin et al. 2002). Diese Strategie wurde auf den autolytischen Salmonellen-Vektor übertragen, in dem eine konstitutive Expressionskassette für LLO mit der Lysekassette auf einem Plasmid kombiniert wurde. In der logarithmischen Wachstumsphase dieses Stammes wird Plasmid-DNA und aktives LLO gemeinsam in das Kulturmedium freigesetzt. Die Freisetzung von LLO durch den autolytischen Stamm ist deutlich effektiver als die durch das *E.coli-hlyA*-Sekretionssystem vermittelte LLO-Sekretion. Da nur ein kleiner Teil der Bakterien in der lytischen Kultur LLO freisetzt, übersteigt die Zahl freigesetzter LLO-Moleküle weitaus die Zahl der mit dem *E.coli-hlyA*-System sekretierten LLO-Moleküle je Bakterium. In der infizierten Wirtszelle ist also zu erwarten, dass einzelne Bakterien des autolytischen Stammes während der Lyse Plasmid-DNA und LLO in konzentrierter Form in das Phagosom ausstoßen und dadurch die LLO-vermittelte Perforation der phagosomalen Membran zur unmittelbaren Freisetzung von Plasmid-DNA in das Wirtszellzytoplasma führt. Erste elektronenmikroskopische Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Vermutung. Bakterien des autolytischen, LLO-exprimierenden Stammes waren in der Lage, in COS7-Zellen die Integrität des Phagosoms zu zerstören und in das Wirtszellzytoplasma zu entweichen. Dagegen verblieben die Bakterien des nicht-lytischen Vergleichsstammes in der membranumgrenzten Vakuole.

Auf kompatiblen Plasmiden basierende autolytische Salmonellen-DNA-Vektoren verfehlten die Induktion einer Transgenexpression *in vitro* und *in vivo*. Die Instabilität dieser Plasmidkombination ist ein entscheidender Nachteil dieses Systems. Andererseits stellt sich die Frage, ob Protein-E überhaupt die lytische Aktivität innerhalb der infizierten Wirtszelle entfaltet, da unter bestimmten Umgebungsbedingungen, z.B. einer erhöhten Konzentration bestimmter Ionen, diese Aktivität wirksam inhibiert wird (Lubitz et al. 1984). Möglich ist auch, dass die Plasmid-DNA durch bakterielle Nukleasen, die auch während der Lyse freigesetzt werden, degradiert wird. In der Kultur autolytischer Salmonellen ist dieser Effekt zu beobachten. Die Deletion Nuklease-kodierender Gene des Salmonellen-Stammes ist ein Weg, diesen DNA-Abbau zu verhindern (Jain und Mekalanos 2000). Das  $\lambda$ -Lyseoperon vermittelt die bakterielle Lyse nach einem ganz anderen Mechanismus als Protein-E. Bereits beschrieben wurde, dass die  $\lambda$ -Lyseoperon-vermittelte Lyse im Gegensatz zu Protein-E nicht zum nukleolytischen Abbau freigesetzter DNA im Kulturmedium führt (Kloos et al. 1994). Aus diesem Grund war der

Austausch von Gen-E durch das  $\lambda$ -Lyseoperon in dem autolytischen System von großem Interesse. Zur Steigerung der lytischen Aktivität wurde zunächst eine verkleinerte Variante des  $\lambda$ -Lyseoperons, bezeichnet als Mini $\lambda$ , konstruiert. Die lytische Aktivität von Protein-E und Mini $\lambda$  ist in der Kultur vergleichbar, während das vollständige  $\lambda$ -Lyseoperon aufgrund der Expression des intrinsischen Inhibitors S107 nur eine geringe lytische Aktivität vermittelt. Entgegen den Ergebnissen von Kloos et al. wurde jedoch auch die aus Mini $\lambda$ -vermittelt, lysierenden Bakterien freigesetzte Plasmid-DNA im Medium durch akkumulierende Nukleasen abgebaut. Die Funktionsfähigkeit des ZPES in den infizierten Wirtszellen wurde durch die ZPES-vermittelte Expression von GFP durch intrazelluläre Salmonellen nachgewiesen. Um die Funktion des Autolysesystems in der infizierten Wirtszelle zu überprüfen, wurde das jeweilige Lysemodul und GFP gemeinsam auf einem Plasmid unter die Kontrolle des ZPES gebracht. In dieser Anordnung ist eine ZPES-induzierte GFP-Expression nur dann möglich, wenn die Lysedetermine unter den intrazellulären Bedingungen inhibiert ist. In den Zellen, infiziert mit den Gen-E- oder mit den Mini $\lambda$ -tragenden lytischen Bakterien, wurden keine leuchtenden Bakterien gefunden. Offenbar führt die Expression beider Lysedeterminanten in den infizierten Zellen zum schnellen Absterben der Bakterien.

Ein entscheidender Nachteil des auf zwei Plasmiden beruhenden autolytischen Salmonellen-DNA-Vektorsystems ist die hohe Instabilität der Plasmidkombination. Die Stabilisierung des Systems könnte durch die chromosomale Integration der Lysedetermine sowie der LLO-Expressionskassette erreicht werden, jedoch ist dieser Ansatz technisch aufwendig, zumal die ZPES-Stämme bereits chromosomale Integrationen mit verschiedenen Selektionsmarkern tragen. Deshalb wurde zunächst das kompatible Plasmidsystem durch ein einziges, integriertes Plasmid ersetzt. Zuerst wurde das Lysemodul auf das eukaryontische HBsAg-Expressionsplasmid übertragen. Um die T7RNAP-vermittelte Hintergrundexpression in den ZPES-Stämmen weitestgehend zu unterbinden, wurde in die Expressionskassette des lytischen Proteins zusätzlich der T7RNAP-spezifische Inhibitor T7-Lysozym eingefügt (Spehr et al. 2000). Die konstitutive LLO-Expressionskassette konnte nicht in das Ein-Plasmid-System integriert werden, vermutlich aufgrund der Toxizität dieser Kassette im Hintergrund des pUC-abgeleiteten Hochkopienzahlplasmids. Möglicherweise kann aber auch auf ein Modul zur Lyse der phagosomalen Membran durch die Wahl eines geeignet attenuierten Impfstammes verzichtet werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass *sifA*-attenuierte Salmonellen wenige Stunden nach Invasion epithelialer Zellen aus der Vakuole in das Zytoplasma entweichen (Beuzon et al. 2000). Ohne das funktionstüchtige SifA-Protein ist das Wachstum der phagosomalen Membran im Zuge der bakteriellen Replikation nicht möglich, so dass schließlich die Integrität des Kompartiments verloren geht. Die Eignung *sifA*-attenuierter Stämme sowie anderer Stämme mit unterschiedlichen Attenuierungen als DNA-Vektoren wird in weiteren Experimenten zu klären sein.

Mehrere, potentiell für den Salmonellen-DNA-Transfer förderliche Eigenschaften besitzt das histonähnliche Protein aus dem hyperthermophilen Eubakterium *Thermotoga maritima* (TmHU). In der Zellkultur hat sich dieses Protein als ein effizientes Transfektionsagens für Plasmid-DNA

erwiesen (Esser et al. 2000). Als kleines bakterielles Protein liess sich TmHU leicht in das Ein-Plasmid-System integrieren. Die Vektoren mit der TmHU-Kassette zeigten unter nicht-selektiven Bedingungen in der Kultur gegenüber den Plasmiden ohne TmHU eine deutlich erhöhte Stabilität. Die TmHU-Kassette ist schon aus diesem Grund eine sinnvolle Ergänzung des Salmonellen-DNA-Vektors. Darüber hinaus unterstützt TmHU möglicherweise den Transfer der Plasmid-DNA aus den autolytischen Bakterien in den Zellkern der infizierten Wirtszelle. Die folgende Sequenz ist vorstellbar: i) die ZPES-vermittelte Autolyse intrazellulärer Bakterien führt zur Freisetzung von TmHU-komplexierter Plasmid-DNA in das Phagosom, ii) aufgrund der positiven Ladung von TmHU wird die phagosomale Membran destabilisiert, so dass die komplexierte DNA in das Zytoplasma gelangt, iii) das intrinsische Kernlokalisationsignal von TmHU vermittelt den gerichteten Transfer in den Zellkern, iv) die Plasmid-DNA ist durch die Assoziation mit TmHU vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Inwieweit TmHU tatsächlich diese verschiedenen Funktionen erfüllt, muss weiter untersucht werden. In der Zellkultur konnte auch mit den TmHU-exprimierenden autolytischen Impfstämmen kein DNA-Transfer anhand der Expression von GFP oder HBsAg nachgewiesen werden. Alternativ zu TmHU könnten auch andere multifunktionelle DNA-Transferproteine für bakterielle DNA-Vektoren adaptiert werden (Uherek und Wels 2000). Möglicherweise findet TmHU als Bestandteil eines solchen künstlichen Fusionsproteins eine Verwendung. Trotz der stabilisierenden Wirkung von TmHU gehen die optimierten Plasmidkonstrukte ohne den selektiven Druck durch Antibiotika in der Bakterienkultur sowie nach oraler Verabreichung der Impfbakterien *in vivo* verloren. Die Verringerung der Komplexität des Plasmidsvektors durch die chromosomale Intergration der bakteriellen Module, vor allem der Lysedeterminante, ist für die Stabilisierung autolytischer, bakterieller DNA-Vektoren von entscheidender Bedeutung. Neue Methoden für die gezielte chromosomale Integration, z.B. die Rekombinase-unterstützte Integration von PCR-Fragmenten (Datsenko und Wanner 2000), sowie die Kenntnis bakterieller Genome werden die Konstruktion stabiler, autolytischer Impfstämme in Zukunft entscheidend erleichtern. Eine etablierte Methode zur Stabilisierung des Expressionsplasmids in Bakterien ist die Komplementierung einer lethalen, chromosomalen Mutation durch das intakte, plasmidkodierte Gen, z.B. *asd* (Nakayama et al. 1988). Diese Strategie würde gleichzeitig die Antibiotika-Resistenz des Plasmidvektors überflüssig machen, so dass eine sichere klinische Anwendung des Impfstammes gewährleistet ist.

Rekombinante, attenuierte Salmonellen sind ein vielversprechendes Trägersystem für heterologe Antigene sowie Plasmid-DNA in der Immunisierung gegen verschiedene Infektionskrankheiten und Krebs (Sirard et al. 1999; Garmory et al. 2002). Durch eine Salmonellen-Lebendvakzine können einerseits potente humorale und zelluläre Immunantworten im mukosalen und systemischen Kompartiment induziert werden, andererseits ist die orale Gabe besonders einfach und die Herstellung der Vakzine sehr kostengünstig. Die Entwicklung einer oralen Salmonellen-DNA-Vakzine gegen Hepatitis-B ist möglicherweise eine sinnvolle Alternative in der breiten prophylaktischen Immunisierung zu der relativ teuren Subunit-Vakzine, ist aber vor allem für die Therapie chronischer HBV-Infektionen ein vielversprechender neuer Ansatz. In endemischen Gebieten ist die frühe Mutter-Kind-Übertragung für eine Vielzahl der

HBV-Infektionen verantwortlich, die dann oft einen chronischen Verlauf nehmen mit möglichen fatalen Folgen, vor allem Leberzirrhose und Leberkrebs. Die Ausheilung chronisch infizierter Patienten ist sehr problematisch, da verfügbare Chemotherapeutika die virale Replikation nur begrenzt einschränken. Ein Antikörper-vermittelter prophylaktischer Schutz kann durch die rekombinante HBsAg-Protein-Vakzine induziert werden, jedoch bleiben ca. 15% aller geimpften Personen nach der Immunisierung seronegativ oder konvertieren nur schwach, wahrscheinlich aufgrund einer genetischen Prädisposition (Kruskall et al. 1992). Die HBsAg-Protein-Vakzine hat keinen therapeutischen Effekt. Für die Heilung einer chronischen Infektion ist die Induktion einer starken Virus-spezifischen, polyklonalen CTL- und Th-Antwort sowie angeborener antiviraler Abwehrmechanismen entscheidend (Michel 2002). Die Vakzinierung mit Plasmid-DNA, kodierend für die eukaryontische HBsAg-Expressionkassette, hat in Mäusen zur Induktion starker humoraler und zellulärer Immunantworten geführt (Davis et al. 1993; Davis et al. 1996), und gilt als eine geeignete Methode für die Vakzinierung nicht-serokonvertierender Personen sowie zur Behandlung chronisch infizierter Patienten (Roy et al. 2000). Der breiten humanen Anwendung einer HBsAg-DNA-Vakzine steht die derzeitig relativ geringe Effizienz in Menschen, die hohen Kosten einer intramuskulären DNA-Vakzine sowie die Risiken hinsichtlich der Übertragung größerer Mengen gereinigter DNA entgegen. In einer Pilotstudie in Mäusen wurde vor kurzem demonstriert, dass der oral verabreichte *aroA*-attenuierte *S. enterica* Typhimurium-Stamm SL7207, als Träger des eukaryontischen HBsAg-Expressionsplasmids pCMV-S, eine HBsAg-spezifische CTL-Antwort induzieren kann (Woo et al. 2001). Im Gegensatz zur intramuskulären DNA-Vakzine konnte diese orale Vakzine jedoch keine andauernde HBsAg-spezifische Antikörperantwort induzieren. Für die therapeutische Behandlung chronischer Hepatitis-B ist möglicherweise gerade eine solche Vakzine vorteilhaft, da die Antikörperantwort für die Virusbeseitigung aus den Hepatozyten keine Rolle spielt.

In dieser Arbeit wurde das herkömmliche eukaryontische HBsAg-Expressionsplasmid vor dem Hintergrund der *aroA*-attenuierten Salmonellen-Stämme SL3261 sowie SL7207 als orale DNA-Vakzine Mäusen nach gleichem Impfschema wie in der Arbeit von Woo et al. verabreicht, jedoch konnte weder die beschriebene Antikörperantwort noch eine CTL-Antwort reproduziert werden (Woo et al. 2001). Im Vergleich mit diesen Stämmen wurden schließlich die optimierten autolytischen Impfstämme getestet. HBsAg-spezifische, systemische Antikörper- sowie CTL-Antworten wurden mit dem optimierten, autolytischen Stamm SL3261::VO330B::YZ220[pHL187a] induziert. In einer von zwei durchgeführten Immunisierungen wurde sogar schon nach der ersten oralen Gabe der Impfbakterien eine höhere spezifische Antikörperantwort induziert, als nach der einmaligen intramuskulären DNA-Vakzinierung. Im Vergleich zur intramuskulären Injektion genügte zur Stimulation dieser potenten Antikörperantwort eine um ca. drei Größenordnungen niedriger dosierte orale DNA-Vakzine. Mukosale, HBsAg-spezifische Antikörperantworten konnten in den immunisierten Tieren nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise führt die Salmonellen-vermittelte Transfektion von Zellen innerhalb der Peyer-Plaques nicht zur Freisetzung von ausreichend Antigen, so dass den lokalen B-Zellen der Stimulus fehlt. Die Sekretion des Antigens durch transfizierte Zellen (Svanholm et al. 1999), oder die Koexpression der katalytischen Domäne



des Cholera-Toxins könnten zur Induktion höherer Antikörperantworten beitragen (Hone et al. 2002). Eine spezifische mukosale Immunität ist wahrscheinlich für einen Schutz vor einer HIV-Infektion besonders wichtig (Belyakov et al. 2001). Das Mukosa-assoziierte Lymphgewebe ist gleichzeitig Ort der primären Infektion sowie Hauptreservoir der Virusreplikation (Veazey et al. 2001). Eine mukosale zelluläre Immunantwort gegen das HIV-Env-Protein wurde mit einer oralen Salmonellen-DNA-Vakzine, basierend auf dem Impfstamm SL7207, bereits demonstriert (Shata et al. 2001). Die Untersuchung der Kapazität einer autolytischen Salmonellen-DNA-Vakzine für die Stimulation humoraler und zellulärer Immunität an den Schleimhäuten ist in diesem Zusammenhang von großem Interesse und Gegenstand weiterer Experimente.

Die gesteigerte Effizienz der autolytischen Salmonellen-DNA-Vektoren im Vergleich zu den nicht-lytischen Stämmen ist wahrscheinlich auf die verbesserte Freisetzung der Plasmid-DNA in den professionellen APC des darmassoziierten lymphoiden Gewebes zurückzuführen. Für die Weiterentwicklung des Konzeptes autolytischer DNA-Vektoren bieten sich Ansatzpunkte auf mehreren Ebenen an. Die Auswahl eines geeigneten Salmonellen-Impfstammes, hinsichtlich der Eigenschaften des Wildtyp-Isolats sowie der eingebrachten attenuierenden Mutationen, ist ausschlaggebend für die Erzeugung eines unterstützenden Mileus für die Freisetzung der DNA-Vakzine. Die Entwicklung eines leicht transferierbaren, *in vivo*-induzierbaren ZPES wurde bereits diskutiert, ebenfalls die Auswahl einer geeigneten Lysedeterminante. Zahlreiche weitere Komponenten zur Unterstützung des Transfers freigesetzter Plasmid-DNA können in den bakteriellen Vektor integriert werden. Der reiche Erfahrungsschatz mit viralen sowie nicht-viralen DNA-Vektorsystemen bietet dafür viele Anstöße. Neben der Verwendung als DNA-Vektoren sind autolytische Salmonellen auch für die Freisetzung von therapeutischen Proteinen sehr interessant, insbesondere in der Tumorthherapie. Lipid-A-defiziente Salmonellen proliferieren nach systemischer Gabe präferentiell im Gewebe etablierter Tumore und tragen zu deren Rückgang bei (Pawelek et al. 1997). Die lokale Freisetzung von therapeutischen Proteinen kann diesen Prozess sicherlich noch verstärken. Die langjährige Erfahrung mit Salmonellen-Lebendimpfstoffen bietet eine ideale Voraussetzung, um das Konzept der bakteriellen Autolyse auf Impfstämme zu übertragen und die Effizienz dieser neuartigen oralen DNA-Vakzine in der Klinik am Patienten zu überprüfen. Neben Salmonellen kann das Autolysesystem aber auch auf andere gramnegative Bakterien übertragen werden, z.B. auf *E.coli*, Shigellen und Yersinien. Entsprechend den unterschiedlichen Zell- und Gewebetropismen dieser Bakterien lassen sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten für autolytische Vektoren ableiten.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aderem, A. and Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Aggarwal, A., Kumar, S., Jaffe, R., Hone, D., Gross, M. and Sadoff, J. (1990) Oral Salmonella: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Exp Med* 172, 1083-1090.
- al Ramadi, B. K., Al Dhaheri, M. H., Mustafa, N., Abouhaidar, M., Xu, D., Liew, F. Y., Lukic, M. L. and Fernandez-Cabezudo, M. J. (2001) Influence of vector-encoded cytokines on anti-Salmonella immunity: divergent effects of interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha. *Infect.Immun.* 69, 3980-3988.
- Albert, M. L., Sauter, B. and Bhardwaj, N. (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.
- Amara, R. R., Villinger, F., Altman, J. D., Lydy, S. L., O'Neil, S. P., Staprans, S. I., Montefiori, D. C., Xu, Y., Herndon, J. G., Wyatt, L. S., Candido, M. A., Kozyr, N. L., Earl, P. L., Smith, J. M., Ma, H. L., Grimm, B. D., Hulse, M. L., Miller, J., McClure, H. M., McNicholl, J. M., Moss, B. and Robinson, H. L. (2001) Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69-74.
- Babiuk, L. A. (1999) Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine* 17, 1587-1595.
- Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H. and Roberts, G. P. (1991) An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* 109, 167-168.
- Barber, G. N. (2001) Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death.Differ.* 8, 113-126.
- Barouch, D. H., Santra, S., Tenner-Racz, K., Racz, P., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Jackson, S. S., Lifton, M. A., Freed, D. C., Perry, H. C., Davies, M. E., Shiver, J. W. and Letvin, N. L. (2002) Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *J.Immunol.* 168, 562-568.
- Behring, E. and Shibasaburo, K. (1890) Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch med Wschr* 16, 1113.
- Belyakov, I. M., Hel, Z., Kelsall, B., Kuznetsov, V. A., Ahlers, J. D., Nacsa, J., Watkins, D. I., Allen, T. M., Sette, A., Altman, J., Woodward, R., Markham, P. D., Clements, J. D., Franchini, G., Strober, W. and Berzofsky, J. A. (2001) Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques. *Nat.Med.* 7, 1320-1326.
- Berglund, P., Smerdou, C., Fleeton, M. N., Tubulekas, I. and Liljestrom, P. (1998) Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat.Biotechnol.* 16, 562-565.
- Bermudes, D., Zheng, L. M. and King, I. C. (2002) Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* 5, 194-199.
- Bernhardt, T. G., Roof, W. D. and Young, R. (2000) Genetic evidence that the bacteriophage phi X174 lysis protein inhibits cell wall synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4297-4302.

- Berzofsky, J. A., Ahlers, J. D. and Belyakov, I. M. (2001) Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nature Rev.Immunol.* 1, 209-219.
- Beuzon, C. R., Meresse, S., Unsworth, K. E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E. and Holden, D. W. (2000) Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J.* 19, 3235-3249.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bohnhoff, M., Miller, C. P. and Martin, W. R. (1964) Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental Salmonella infection. *J.Exp.Med.* 120, 817-828.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Brandtzaeg, P., Farstad, I. N. and Haraldsen, G. (1999) Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol.Today* 20, 267-277.
- Brennan, M. A. and Cookson, B. T. (2000) Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol.Microbiol.* 38, 31-40.
- Bumann, D. (2001) Regulated antigen expression in live recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect.Immun.* 69, 7493-7500.
- Bumann, D., Hueck, C., Aebischer, T. and Meyer, T. F. (2000) Recombinant live Salmonella spp. for human vaccination against heterologous pathogens. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 27, 357-364.
- Cardenas, L. and Clements, J. D. (1993) Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine* 11, 126-135.
- Catic, A., Dietrich, G., Gentschev, I., Goebel, W., Kaufmann, S. H. and Hess, J. (1999) Introduction of protein or DNA delivered via recombinant Salmonella typhimurium into the major histocompatibility complex class I presentation pathway of macrophages. *Microbes.Infect.* 1, 113-121.
- Cattozzo, E. M., Stocker, B. A., Radaelli, A., De Giuli, M. C. and Tognon, M. (1997) Expression and immunogenicity of V3 loop epitopes of HIV-1, isolates SC and WMJ2, inserted in Salmonella flagellin. *J.Biotechnol.* 56, 191-203.
- Chang, A. C. and Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J.Bacteriol.* 134, 1141-1156.
- Chatfield, S. N., Charles, I. G., Makoff, A. J., Oxe, M. D., Dougan, G., Pickard, D., Slater, D. and Fairweather, N. F. (1992) Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in Salmonella oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Biotechnology (N.Y.)* 10, 888-892.
- Chattergoon, M. A., Kim, J. J., Yang, J. S., Robinson, T. M., Lee, D. J., Dentchev, T., Wilson, D. M., Ayyavoo, V. and Weiner, D. B. (2000) Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nat.Biotechnol.* 18, 974-979.

- Chen, S. C., Jones, D. H., Fynan, E. F., Farrar, G. H., Clegg, J. C., Greenberg, H. B. and Herrmann, J. E. (1998) Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J. Virol.* 72, 5757-5761.
- Condon, C., Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K. and Falo, L. D., Jr. (1996) DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* 2, 1122-1128.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Cossart, P. and Lecuit, M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17, 3797-3806.
- Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C. and Berche, P. (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 57, 3629-3636.
- Coulson, N. M., Fulop, M. and Titball, R. W. (1994) Effect of different plasmids on colonization of mouse tissues by the aromatic amino acid dependent *Salmonella typhimurium* SL 3261. *Microb. Pathog.* 16, 305-311.
- Courvalin, P., Goussard, S. and Grillot-Courvalin, C. (1995) Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C.R.Acad.Sci.III* 318, 1207-1212.
- Craig, N. L. (1991) Tn7: a target site-specific transposon. *Mol. Microbiol.* 5, 2569-2573.
- Darji, A., Guzman, C. A., Gerstel, B., Wachholz, P., Timmis, K. N., Wehland, J., Chakraborty, T. and Weiss, S. (1997) Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 91, 765-775.
- Darji, A., zur, L. S., Garbe, A. I., Chakraborty, T. and Weiss, S. (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27, 341-349.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 6640-6645.
- Davis, H. L., Mancini, M., Michel, M. L. and Whalen, R. G. (1996) DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* 14, 910-915.
- Davis, H. L., Michel, M. L. and Whalen, R. G. (1993) DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1847-1851.
- Davis, H. L., Millan, C. L. and Watkins, S. C. (1997) Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. *Gene Ther.* 4, 181-188.
- Davis, M. G. and Huang, E. S. (1988) Transfer and expression of plasmids containing human cytomegalovirus immediate-early gene 1 promoter-enhancer sequences in eukaryotic and prokaryotic cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10, 6-12.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6568-6572.

- DeVico, A. L., Fouts, T. R., Shata, M. T., Kamin-Lewis, R., Lewis, G. K. and Hone, D. M. (2002) Development of an oral prime-boost strategy to elicit broadly neutralizing antibodies against HIV-1. *Vaccine* 20, 1968-1974.
- Dietrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S. H., Hess, J., Szalay, A. A. and Goebel, W. (1998) Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat.Biotechnol.* 16, 181-185.
- Dietrich, G., Spreng, S., Favre, D., Viret, J. F. and Guzman, C. A. (2003) Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 5, 10-19.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B. and Liu, M. A. (1998) DNA vaccines. *Dev.Biol.Stand.* 95, 43-53.
- Dramsi, S. and Cossart, P. (2002) Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J.Cell Biol.* 156, 943-946.
- Dubendorff, J. W. and Studier, F. W. (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J.Mol.Biol.* 219, 45-59.
- Ellis, R. W. (1991) Recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine: the prototype for biotechnologically derived old vaccines. *Bioprocess.Technol.* 13, 355-369.
- Emoto, M., Emoto, Y., Buchwalow, I. B. and Kaufmann, S. H. (1999) Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. *Eur.J.Immunol.* 29, 650-659.
- Engels, E. A., Falagas, M. E., Lau, J. and Bennish, M. L. (1998) Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. *BMJ* 316, 110-116.
- Eo, S. K., Gierynska, M., Kamar, A. A. and Rouse, B. T. (2001) Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J.Immunol.* 166, 5473-5479.
- Esser, D., Amanuma, H., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Rudolph, R. and Bohm, G. (2000) A hyperthermostable bacterial histone-like protein as an efficient mediator for transfection of eukaryotic cells. *Nat.Biotechnol.* 18, 1211-1213.
- Feltquate, D. M., Heaney, S., Webster, R. G. and Robinson, H. L. (1997) Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J.Immunol.* 158, 2278-2284.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. and Sansonetti, P. (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect.Immun.* 55, 2822-2829.
- Galan, J. E., Nakayama, K. and Curtiss, R., III (1990) Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* 94, 29-35.
- Galen, J. E. and Levine, M. M. (2001) Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol.* 9, 372-376.
- Gallichan, W. S. and Rosenthal, K. L. (1995) Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* 13, 1589-1595.

- Garcia-del Portillo, F. and Finlay, B. B. (1995) Targeting of Salmonella typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J.Cell Biol.* 129, 81-97.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W., Maguire, M. E. and Finlay, B. B. (1992) Characterization of the micro-environment of Salmonella typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol.Microbiol.* 6, 3289-3297.
- Garcia, V. E., Soncini, F. C. and Groisman, E. A. (1996) Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence. *Cell* 84, 165-174.
- Garmory, H. S., Brown, K. A. and Titball, R. W. (2002) Salmonella vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol.Rev.* 26, 339-353.
- Gentschev, I., Dietrich, G. and Goebel, W. (2002) The E. coli alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* 10, 39-45.
- Gentschev, I., Sokolovic, Z., Mollenkopf, H. J., Hess, J., Kaufmann, S. H., Kuhn, M., Krohne, G. F. and Goebel, W. (1995) Salmonella strain secreting active listeriolysin changes its intracellular localization. *Infect.Immun.* 63, 4202-4205.
- Germanier, R. and Fuer, E. (1975) Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of Salmonella typhi: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J.Infect.Dis.* 131, 553-558.
- Gonzalez, C., Hone, D., Noriega, F. R., Tacket, C. O., Davis, J. R., Losonsky, G., Nataro, J. P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E. and . (1994) Salmonella typhi vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J.Infect.Dis.* 169, 927-931.
- Gorvel, J. P. and Meresse, S. (2001) Maturation steps of the Salmonella-containing vacuole. *Microbes.Infect.* 3, 1299-1303.
- Grillot-Courvalin, C., Goussard, S. and Courvalin, P. (2002) Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell Microbiol.* 4, 177-186.
- Grundling, A., Smith, D. L., Blasi, U. and Young, R. Y. (2000) Dimerization between the holin and holin inhibitor of phage lambda. *J.Bacteriol.* 182, 6075-6081.
- Gulig, P. A., Doyle, T. J., Clare-Salzler, M. J., Maiese, R. L. and Matsui, H. (1997) Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- Salmonella typhimurium is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect.Immun.* 65, 5191-5197.
- Hanke, T., Schneider, J., Gilbert, S. C., Hill, A. V. and McMichael, A. (1998) DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine* 16, 426-435.
- Heinemann, J. A. and Sprague, G. F., Jr. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 340, 205-209.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

- Hense, M., Domann, E., Krusch, S., Wachholz, P., Dittmar, K. E., Rohde, M., Wehland, J., Chakraborty, T. and Weiss, S. (2001) Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cell Microbiol.* 3, 599-609.
- Hensel, M. (2000) Salmonella pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36, 1015-1023.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghorri, N., Falkow, S. and Zychlinsky, A. (1999) The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 2396-2401.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W. and Kaufmann, S. H. (1996) Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant Salmonella vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 1458-1463.
- Hohmann, E. L., Oletta, C. A., Loomis, W. P. and Miller, S. I. (1995) Macrophage-inducible expression of a model antigen in Salmonella typhimurium enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 2904-2908.
- Hoiseth, S. K. and Stocker, B. A. (1981) Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238-239.
- Hone, D. M., DeVico, A. L., Fouts, T. R., Onyabe, D. Y., Agwale, S. M., Wambebe, C. O., Blattner, W. A., Gallo, R. C. and Lewis, G. K. (2002) Development of vaccination strategies that elicit broadly neutralizing antibodies against human immunodeficiency virus type 1 in both the mucosal and systemic immune compartments. *J Hum. Virol.* 5, 17-23.
- Hopkins, S. A., Niedergang, F., Cortesy-Theulaz, I. E. and Kraehenbuhl, J. P. (2000) A recombinant Salmonella typhimurium vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2, 59-68.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Irvine, K. R., Parkhurst, M. R., Shulman, E. P., Tupesis, J. P., Custer, M., Touloukian, C. E., Robbins, P. F., Yafal, A. G., Greenhalgh, P., Suttmuller, R. P., Offringa, R., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. (1999) Recombinant virus vaccination against "self" antigens using anchor-fixed immunogens. *Cancer Res.* 59, 2536-2540.
- Ishikawa, T., Kono, D., Chung, J., Fowler, P., Theofilopoulos, A., Kakumu, S. and Chisari, F. V. (1998) Polyclonality and multispecificity of the CTL response to a single viral epitope. *J. Immunol.* 161, 5842-5850.
- Iwasaki, A., Stiernholm, B. J., Chan, A. K., Berinstein, N. L. and Barber, B. H. (1997) Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *J. Immunol.* 158, 4591-4601.
- Jain, V. and Mekalanos, J. J. (2000) Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for Vibrio cholerae- and Salmonella enterica serovar typhimurium-based DNA vaccine delivery systems. *Infect. Immun.* 68, 986-989.
- Jenner, E. (1798) An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox. London 1798. Dover, New York.

- Jones, B. D., Ghorri, N. and Falkow, S. (1994) Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J.Exp.Med.* 180, 15-23.
- Kantele, A., Kantele, J. M., Savilahti, E., Westerholm, M., Arvilommi, H., Lazarovits, A., Butcher, E. C. and Makela, P. H. (1997) Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. *J.Immunol.* 158, 574-579.
- Karasuyama, H. and Melchers, F. (1988) Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur.J.Immunol.* 18, 97-104.
- Kaufmann, S. H., Fensterle, J. and Hess, J. (1999) The need for a novel generation of vaccines. *Immunobiology* 201, 272-282.
- Kim, J. J., Bagarazzi, M. L., Trivedi, N., Hu, Y., Kazahaya, K., Wilson, D. M., Ciccarelli, R., Chattergoon, M. A., Dang, K., Mahalingam, S., Chalian, A. A., Agadjanyan, M. G., Boyer, J. D., Wang, B. and Weiner, D. B. (1997) Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat.Biotechnol.* 15, 641-646.
- Kloos, D. U., Stratz, M., Guttler, A., Steffan, R. J. and Timmis, K. N. (1994) Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. *J.Bacteriol.* 176, 7352-7361.
- Koch, R. (1876) Untersuchungen ueber Bakterien V. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begruendend auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. *Beitr.z.Biol.D.Pflanzen* 2, 277-310.
- Komoriya, K., Shibano, N., Higano, T., Azuma, N., Yamaguchi, S. and Aizawa, S. I. (1999) Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of Salmonella typhimurium. *Mol.Microbiol.* 34, 767-779.
- Krieg, A. M. and Davis, H. L. (2001) Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 3, 15-24.
- Kruskall, M. S., Alper, C. A., Awdeh, Z., Yunis, E. J. and Marcus-Bagley, D. (1992) The immune response to hepatitis B vaccine in humans: inheritance patterns in families. *J.Exp.Med* 175, 495-502.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larocca, D., Kassner, P. D., Witte, A., Ladner, R. C., Pierce, G. F. and Baird, A. (1999) Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *FASEB J.* 13, 727-734.
- Leitner, W. W., Ying, H. and Restifo, N. P. (1999) DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 18, 765-777.
- Lessl, M. and Lanka, E. (1994) Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77, 321-324.
- Levy, S. B. and Marshall, B. (1981) Risk assessment studies of E. coli host-vector systems. *Recomb.DNA Tech.Bull.* 4, 91-98.



- Lewis, K. (2000) Programmed death in bacteria. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64, 503-514.
- Lillard, J. W., Jr., Boyaka, P. N., Singh, S. and McGhee, J. R. (2001) Salmonella-mediated mucosal cell-mediated immunity. *Cell Mol.Biol.* 47, 1115-1120.
- Liu, W. J., Zhao, K. N., Gao, F. G., Leggatt, G. R., Fernando, G. J. and Frazer, I. H. (2001) Polynucleotide viral vaccines: codon optimisation and ubiquitin conjugation enhances prophylactic and therapeutic efficacy. *Vaccine* 20, 862-869.
- Lo, W. F., Ong, H., Metcalf, E. S. and Soloski, M. J. (1999) T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to Salmonella infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J.Immunol.* 162, 5398-5406.
- Loessner, H. (1996) Eignung des latenten Replikons des Epstein-Barr-Virus für die Integration in lebergerichtete Gentherapievektoren. Diplomarbeit . Humboldt-Universität zu Berlin.
- Lubitz, W., Halfmann, G. and Plapp, R. (1984) Lysis of Escherichia coli after infection with phiX174 depends on the regulation of the cellular autolytic system. *J.Gen.Microbiol.* 130, 1079-1087.
- MacGregor, R. R., Boyer, J. D., Ugen, K. E., Lacy, K. E., Gluckman, S. J., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M. A., Baine, Y., Higgins, T. J., Ciccarelli, R. B., Coney, L. R., Ginsberg, R. S. and Weiner, D. B. (1998) First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J.Infect.Dis.* 178, 92-100.
- Maratea, D., Young, K. and Young, R. (1985) Deletion and fusion analysis of the phage phi X174 lysis gene E. *Gene* 40, 39-46.
- Maskell, D. J., Sweeney, K. J., O'Callaghan, D., Hormaeche, C. E., Liew, F. Y. and Dougan, G. (1987) Salmonella typhimurium aroA mutants as carriers of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit to the murine secretory and systemic immune systems. *Microb.Pathog.* 2, 211-221.
- Mastroeni, P., Chabalgoity, J. A., Dunstan, S. J., Maskell, D. J. and Dougan, G. (2001) Salmonella: immune responses and vaccines. *Vet.J.* 161, 132-164.
- Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B. and Hormaeche, C. E. (1993) Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect.Immun.* 61, 3981-3984.
- Maurer, J., Jose, J. and Meyer, T. F. (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli. *J.Bacteriol.* 179, 794-804.
- McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M. and Kiyono, H. (1992) The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10, 75-88.
- McMichael, A. and Hanke, T. (2002) The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? *Nature Rev.Immunol.* 2, 283-291.
- McSorley, S. J., Asch, S., Costalonga, M., Reinhardt, R. L. and Jenkins, M. K. (2002) Tracking salmonella-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection. *Immunity.* 16, 365-377.
- Meidenbauer, N., Andreesen, R. and Mackensen, A. (2001) Dendritic cells for specific cancer immunotherapy. *Biol.Chem.* 382, 507-520.

- Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. and Maniatis, T. (1981) Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* 27, 279-288.
- Mercado, R., Vijn, S., Allen, S. E., Kerksiek, K., Pilip, I. M. and Pamer, E. G. (2000) Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J.Immunol.* 165, 6833-6839.
- Micheel, B., Heymann, S., Scharte, G., Bottger, V., Vogel, F., Dubel, S., Breitling, F., Little, M. and Behrsing, O. (1994) Production of monoclonal antibodies against epitopes of the main coat protein of filamentous fd phages. *J.Immunol.Methods* 171, 103-109.
- Michel, M. L. (2002) Towards immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections. *Vaccine* 20; Suppl 4:A83-8., A83-A88.
- Michetti, P., Mahan, M. J., Slauch, J. M., Mekalanos, J. J. and Neutra, M. R. (1992) Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* 60, 1786-1792.
- Miller, V. L. and Mekalanos, J. J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J.Bacteriol.* 170, 2575-2583.
- Mittrucker, H. W. and Kaufmann, S. H. (2000) Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J.Leukoc.Biol.* 67, 457-463.
- Mittrucker, H. W., Raupach, B., Kohler, A. and Kaufmann, S. H. (2000) Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J.Immunol.* 164, 1648-1652.
- Monack, D. M., Hersh, D., Ghorri, N., Bouley, D., Zychlinsky, A. and Falkow, S. (2000) *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J.Exp.Med.* 192, 249-258.
- Morona, R., Yeadon, J., Considine, A., Morona, J. K. and Manning, P. A. (1991) Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *Escherichia coli* *thyA*<sup>+</sup> gene: application to cholera vaccine development. *Gene* 107, 139-144.
- Morrow, C. D., Novak, M. J., Ansardi, D. C., Porter, D. C. and Moldoveanu, Z. (1999) Recombinant viruses as vectors for mucosal immunity. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 236, 255-273.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K. and Modolell, M. (1998) Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J.Exp.Med.* 187, 2103-2108.
- Nakayama, K., Kelly, S. M. and Curtiss, R., III (1988) Construction of an *Asd*<sup>+</sup> expression-cloning vector : stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnology (N.Y.)* 6, 693-697.
- Narum, D. L., Kumar, S., Rogers, W. O., Fuhrmann, S. R., Liang, H., Oakley, M., Taye, A., Sim, B. K. and Hoffman, S. L. (2001) Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merozoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infect.Immun.* 69, 7250-7253.

- Nato, F., Reich, K., Lhopital, S., Rouyre, S., Geoffroy, C., Mazie, J. C. and Cossart, P. (1991) Production and characterization of neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies against listeriolysin O. *Infect.Immun.* 59, 4641-4646.
- Nauciel, C. and Espinasse-Maes, F. (1992) Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. *Infect.Immun.* 60, 450-454.
- Neutra, M. R., Mantis, N. J. and Kraehenbuhl, J. P. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat.Immunol.* 2, 1004-1009.
- Niethammer, A. G., Xiang, R., Ruehlmann, J. M., Lode, H. N., Dolman, C. S., Gillies, S. D. and Reisfeld, R. A. (2001) Targeted interleukin 2 therapy enhances protective immunity induced by an autologous oral DNA vaccine against murine melanoma. *Cancer Res.* 61, 6178-6184.
- Nomoto, A. and Arita, I. (2002) Eradication of poliomyelitis. *Nat.Immunol.* 3, 205-208.
- Norman, J. A., Hobart, P., Manthorpe, M., Felgner, P. and Wheeler, C. (1997) Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine* 15, 801-803.
- Orr, N., Galen, J. E. and Levine, M. M. (2001) Novel use of anaerobically induced promoter, dmsA, for controlled expression of fragment C of tetanus toxin in live attenuated Salmonella enterica serovar Typhi strain CVD 908-htrA. *Vaccine* 19, 1694-1700.
- Paglia, P., Medina, E., Arioli, I., Guzman, C. A. and Colombo, M. P. (1998) Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with Salmonella typhimurium, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 92, 3172-3176.
- Paglia, P., Terrazzini, N., Schulze, K., Guzman, C. A. and Colombo, M. P. (2000) In vivo correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated Salmonella as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 7, 1725-1730.
- Pang, T., Levine, M. M., Ivanoff, B., Wain, J. and Finlay, B. B. (1998) Typhoid fever - important issues still remain. *Trends Microbiol.* 6, 131-133.
- Pasteur, L. (1880) De l'attenuation du virus du choléra des poules. *C.R.Acad.Sci.Paris* 91, 673-680.
- Pasteur, L. (1885) Méthode pour prévenir la rage après morsure. *C.R.Acad.Sci.Paris* 101, 765-772.
- Pawelek, J. M., Low, K. B. and Bermudes, D. (1997) Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* 57, 4537-4544.
- Pizza, M., Giuliani, M. M., Fontana, M. R., Monaci, E., Douce, G., Dougan, G., Mills, K. H., Rappuoli, R. and Del Giudice, G. (2001) Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine* 19, 2534-2541.
- Plasterk, R. H., Ilmer, T. A. and Van de, P. P. (1983) Site-specific recombination by  $\phi$ 80 of bacteriophage Mu: inversions and deletions. *Virology* 127, 24-36.
- Porgador, A., Irvine, K. R., Iwasaki, A., Barber, B. H., Restifo, N. P. and Germain, R. N. (1998) Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T cells after gene gun immunization. *J.Exp.Med.* 188, 1075-1082.

- Ramarathinam, L., Niesel, D. W. and Klimpel, G. R. (1993) Salmonella typhimurium induces IFN-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J.Immunol.* 150, 3973-3981.
- Ramshaw, I. A. and Ramsay, A. J. (2000) The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol.Today* 21, 163-165.
- Rathman, M., Sjaastad, M. D. and Falkow, S. (1996) Acidification of phagosomes containing Salmonella typhimurium in murine macrophages. *Infect.Immun.* 64, 2765-2773.
- Raupach, B. and Kaufmann, S. H. (2001) Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate Salmonella vaccine strain? *Microbes.Infect.* 3, 1261-1269.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat.Immunol.* 2, 361-367.
- Richter-Dahlfors, A., Buchan, A. M. and Finlay, B. B. (1997) Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J.Exp.Med.* 186, 569-580.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S. (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat.Cell Biol.* 1, 362-368.
- Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J. S., Nguyen, M. D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R. S., Richman, D. D., Carson, D. A. and Raz, E. (1997) Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat.Med.* 3, 849-854.
- Roy, M. J., Wu, M. S., Barr, L. J., Fuller, J. T., Tussey, L. G., Speller, S., Culp, J., Burkholder, J. K., Swain, W. F., Dixon, R. M., Widera, G., Vessey, R., King, A., Ogg, G., Gallimore, A., Haynes, J. R. and Heydenburg, F. D. (2000) Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine* 19, 764-778.
- Russmann, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y., Galan, J. E. and Donis, R. O. (1998) Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* 281, 565-568.
- Sabin, A. B. and Boulger, L. R. (1973) History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *Journal Biology Standardization* 1, 115-117.
- Sasaki, S., Amara, R. R., Oran, A. E., Smith, J. M. and Robinson, H. L. (2001) Apoptosis-mediated enhancement of DNA-raised immune responses by mutant caspases. *Nat.Biotechnol.* 19, 543-547.
- Schaffner, W. (1980) Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77, 2163-2167.
- Schirmbeck, R., Melber, K., Kuhrober, A., Janowicz, Z. A. and Reimann, J. (1994) Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J.Immunol.* 152, 1110-1119.
- Schirmbeck, R. and Reimann, J. (2001) Revealing the potential of DNA-based vaccination: lessons learned from the hepatitis B virus surface antigen. *Biol.Chem.* 382, 543-552.

- Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B. and Doerfler, W. (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 961-966.
- Sedegah, M., Jones, T. R., Kaur, M., Hedstrom, R., Hobart, P., Tine, J. A. and Hoffman, S. L. (1998) Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 7648-7653.
- Shata, M. T., Reitz, M. S., Jr., DeVico, A. L., Lewis, G. K. and Hone, D. M. (2001) Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8(+) T-cells develop after intragastric vaccination with a Salmonella Env DNA vaccine vector. *Vaccine* 20, 623-629.
- Shata, M. T., Stevceva, L., Agwale, S., Lewis, G. K. and Hone, D. M. (2000) Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol.Med.Today* 6, 66-71.
- Sheu, S. Y. and Lo, S. J. (1995) Deletion or alteration of hydrophobic amino acids at the first and the third transmembrane domains of hepatitis B surface antigen enhances its production in Escherichia coli. *Gene* 160, 179-184.
- Simon, R., Priefer, U. B. and Puhler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784-791.
- Sirard, J. C., Niedergang, F. and Kraehenbuhl, J. P. (1999) Live attenuated Salmonella: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol.Rev.* 171, 5-26.
- Sizemore, D. R., Branstrom, A. A. and Sadoff, J. C. (1995) Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270, 299-302.
- Sizemore, D. R., Branstrom, A. A. and Sadoff, J. C. (1997) Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* 15, 804-807.
- Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Spehr, V., Frahm, D. and Meyer, T. F. (2000) Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. *Gene* 257, 259-267.
- Strebel, P. M., Sutter, R. W., Cochi, S. L., Biellik, R. J., Brink, E. W., Kew, O. M., Pallansch, M. A., Orenstein, W. A. and Hinman, A. R. (1992) Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin.Infect.Dis.* 14, 568-579.
- Strugnell, R. A., Drew, D., Mercieca, J., DiNatale, S., Firez, N., Dunstan, S. J., Simmons, C. P. and Vadolas, J. (1997) DNA vaccines for bacterial infections. *Immunol.Cell Biol.* 75, 364-369.
- Studier, F. W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J.Mol.Biol.* 219, 37-44.
- Su, G. F., Brahmabhatt, H. N., de, L., V, Wehland, J. and Timmis, K. N. (1992) Extracellular export of Shiga toxin B-subunit/haemolysin A (C-terminus) fusion protein expressed in Salmonella typhimurium aroA-mutant and stimulation of B-subunit specific antibody responses in mice. *Microb.Pathog.* 13, 465-476.

- Svanholm, C., Bandholtz, L., Lobell, A. and Wigzell, H. (1999) Enhancement of antibody responses by DNA immunization using expression vectors mediating efficient antigen secretion. *J.Immunol.Methods* 228, 121-130.
- Tang, D. C., DeVit, M. and Johnston, S. A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154.
- Thomson, S. A., Sherritt, M. A., Medveczky, J., Elliott, S. L., Moss, D. J., Fernando, G. J., Brown, L. E. and Suhrbier, A. (1998) Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J.Immunol.* 160, 1717-1723.
- Tubulekas, I., Berglund, P., Fleeton, M. and Liljestrom, P. (1997) Alphavirus expression vectors and their use as recombinant vaccines: a minireview. *Gene* 190, 191-195.
- Turner, S. J., Carbone, F. R. and Strugnell, R. A. (1993) Salmonella typhimurium delta aroA delta aroD mutants expressing a foreign recombinant protein induce specific major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice. *Infect.Immun.* 61, 5374-5380.
- Tuting, T. (1999) The immunology of cutaneous DNA immunization. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 1, 216-225.
- Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T. and Koide, Y. (1998) Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J.Immunol.* 161, 5594-5599.
- Uherek, C. and Wels, W. (2000) DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 44, 153-166.
- UNO. (2001) Declaration of commitment on HIV/AIDS "Global Crisis - Global Action". <http://www.un.org/ga/aids/coverage/FinalDeclarationHIVAIDS.html>.
- Urashima, M., Suzuki, H., Yuza, Y., Akiyama, M., Ohno, N. and Eto, Y. (2000) An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated Salmonella typhimurium. *Blood* 95, 1258-1263.
- Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277, 2007-2011.
- van Ginkel, F. W., Nguyen, H. H. and McGhee, J. R. (2000) Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg.Infect.Dis.* 6, 123-132.
- Vassiloyanakopoulos, A. P., Okamoto, S. and Fierer, J. (1998) The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to Salmonella dublin infections in genetically susceptible and resistant mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 7676-7681.
- Vazquez-Torres, A. and Fang, F. C. (2001) Oxygen-dependent anti-Salmonella activity of macrophages. *Trends Microbiol.* 9, 29-33.
- Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D. W., Lucia, S. M., Dinauer, M. C., Mastroeni, P. and Fang, F. C. (2000) Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287, 1655-1658.
- Veazey, R. S., Marx, P. A. and Lackner, A. A. (2001) The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol.* 22, 626-633.

- Vidal, S., Tremblay, M. L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S. and Gros, P. (1995) The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J.Exp.Med.* 182, 655-666.
- Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153, 3-11.
- Weiss, S. and Krusch, S. (2001) Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol.Chem.* 382, 533-541.
- Whalen, R. G. (1996) DNA vaccines, cyberspace and self-help programs. *Intervirology* 39, 120-125.
- WHO. (1980) The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication. In History of International Public Health No. 4., WHO, Geneva.
- WHO. (2001) AIDS epidemic update. In AIDS epidemic update. UNAIDS / WHO, Geneva.
- WHO. (1998) The World Health Report 1998 - Life in the 21st century - A vision for all. <http://www.who.int/whr/1998/whr-en.html>.
- Wiesmuller, K. H., Fleckenstein, B. and Jung, G. (2001) Peptide vaccines and peptide libraries. *Biol.Chem.* 382, 571-579.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P. L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.
- Woo, P. C., Wong, L. P., Zheng, B. J. and Yuen, K. Y. (2001) Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine* 19, 2945-2954.
- Wrobel, B. and Wegrzyn, G. (1998) Replication regulation of ColE1-like plasmids in amino acid-starved *Escherichia coli*. *Plasmid* 39, 48-62.
- Wu, Y., Wang, X., Csencsits, K. L., Haddad, A., Walters, N. and Pascual, D. W. (2001) M cell-targeted DNA vaccination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 9318-9323.
- Xiang, R., Lode, H. N., Chao, T. H., Ruehlmann, J. M., Dolman, C. S., Rodriguez, F., Whitton, J. L., Overwijk, W. W., Restifo, N. P. and Reisfeld, R. A. (2000) An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 5492-5497.
- Xiang, R., Primus, F. J., Ruehlmann, J. M., Niethammer, A. G., Silletti, S., Lode, H. N., Dolman, C. S., Gillies, S. D. and Reisfeld, R. A. (2001) A dual-function DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and CD40 ligand trimer induces T cell-mediated protective immunity against colon cancer in carcinoembryonic antigen-transgenic mice. *J.Immunol.* 167, 4560-4565.
- Yan, Z. X. and Meyer, T. F. (1996) Mixed population approach for vaccination with live recombinant *Salmonella* strains. *J Biotechnol.* 44, 197-201.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Ying, H., Zaks, T. Z., Wang, R. F., Irvine, K. R., Kammula, U. S., Marincola, F. M., Leitner, W. W. and Restifo, N. P. (1999) Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat.Med.* 5, 823-827.

- Yokoyama-Kobayashi, M. and Kato, S. (1993) Recombinant f1 phage particles can transfect monkey COS-7 cells by DEAE dextran method. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 192, 935-939.
- Yokoyama-Kobayashi, M. and Kato, S. (1994) Recombinant f1 phage-mediated transfection of mammalian cells using lipopolyamine technique. *Anal.Biochem.* 223, 130-134.
- Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y. I., Iwakura, Y. and Nakanishi, K. (1997) Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 3948-3953.
- Young, I., Wang, I. and Roof, W. D. (2000) Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* 8, 120-128.
- Young, R. (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol.Rev.* 56, 430-481.
- Yrlid, U. and Wick, M. J. (2000) Salmonella-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. *J.Exp.Med.* 191, 613-624.
- Zheng, L. M., Luo, X., Feng, M., Li, Z., Le, T., Ittensohn, M., Trailsmith, M., Bermudes, D., Lin, S. L. and King, I. C. (2000) Tumor amplified protein expression therapy: Salmonella as a tumor-selective protein delivery vector. *Oncol.Res.* 12, 127-135.
- Zhou, D. and Galan, J. (2001) Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes.Infect.* 3, 1293-1298.
- Zoller, M. and Christ, O. (2001) Prophylactic tumor vaccination: comparison of effector mechanisms initiated by protein versus DNA vaccination. *J.Immunol.* 166, 3440-3450.



## 9 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom ( <i>acquired immune deficiency syndrome</i> )
Amp	Ampicillin
AP	alkaline Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
ATCC	Amerikanische Typenkultursammlung ( <i>American Type Culture Collection</i> )
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Cam	Chloramphenicol
cfu	Kolonie-bildende Einheit ( <i>colony forming unit</i> )
CMV	Cytomegalievirus
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymimmuntest ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FKS	fötales Kälberserum
Fus	Fusarinsäure
<i>g</i>	relative Zentrifugationsbeschleunigung
g/v	Gewicht/Volumen
gDNA	genomische DNA
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächenantigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	menschliches Immunschwäche-Virus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
HSV	<i>Herpes simplex</i> -Virus
i.g.	intra-gastrisch

i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
iFKS	inaktiviertes fötales Kälberserum
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	Umgekehrte Wiederholungssequenz ( <i>inverted repeat</i> )
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LLO	Listeriolysin O
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	lange terminale Wiederholungssequenz ( <i>long terminal repeat</i> )
mAK	monoklonaler Antikörper
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphoides Gewebe
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
mRNA	Matrizen-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MOI	Infektionsdosis ( <i>multiplicity of infection</i> )
Mq	Makrophagen
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
nd.	nicht determiniert
NK	natürliche Killerzellen ( <i>natural killer cells</i> )
OD	optische Dichte, Index bezeichnet Wellenlänge in nm
P	Promotor
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
R	resistent
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
slg	sekretorisches Immunglobulin
SPI	Salmonellen-Pathogenitätsinsel
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Strep	Streptomycin
<i>S.enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium
Typhimurium	
t	Terminator
T7RNAP	T7-RNA-Polymerase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure

---

Tet	Tetrazyklin
Th	T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TmHU	Histon-ähnliches Protein von <i>Thermotoga maritima</i>
Tn	Transposon
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
u/min	Umdrehungen je Minute
U	Einheit ( <i>unit</i> )
ÜN	übernacht
UNO	Vereinte Nationen ( <i>United Nations Organization</i> )
UV	ultravioletter Lichtbereich
v/v	Volumen/Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZPES	Zwei-Phasen-Expressionssystem

Für Maßeinheiten wurde in der Regel das SI-System und für einfache Verbindungen die chemischen Formeln als Abkürzungen verwendet. Gebräuchliche englische Bezeichnungen sind eingeklammert, in kursiver Schreibweise angegeben.

**Veröffentlichungen**

**Loessner, H., Spehr, V., Bumann, D. and Meyer, T. F.,** Optimization of *Salmonella*-based vaccines for genetic vaccination. Biospektrum Sonderausgabe 2001.

**Loessner, H., Spehr, V., and Meyer, T. F.,** Comparison of lysis determinants derived from bacteriophages  $\phi$ X174 and Lambda in a novel *Salmonella* DNA delivery system. Int.J.Med.Microbiol. 291[32 supplement]. 2001.

**Loessner, H., Spehr, V., Guzman, C. A., and Meyer, T. F.,** Towards an improved *Salmonella*-based hepatitis B surface antigen DNA vaccine. Abstractbook Workshop "Viruslike particles as vaccines", Charité, Berlin, Germany. 2001.

**Loessner, H., Spehr, V., Guzman, C. A., and Meyer, T. F.,** 2003. Phage  $\phi$ X174 protein E mediated autolysis of an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain results in the release of plasmid DNA and active listeriolysin O. *in Vorbereitung*.

**Spehr, V., Loessner, H., Yan, Z.X., Schaap, D., and Meyer, T. F.,** 2003. A novel system for the continuous expression of toxic proteins in culture. *in Vorbereitung*.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas F. Meyer danke ich für die Themenstellung zu dieser Arbeit, die fachliche Begleitung sowie die materiellen Voraussetzungen.

Herrn Prof. Dr. Krüger danke ich für die Begutachtung und die Vertretung dieser Arbeit an der Humboldt-Universität.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Carlos A. Guzman für wichtige Hinweise zur Durchführung der Immunisierungen, für die Diskussionen der Ergebnisse, für das kritische Lesen sowie die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Volker Spehr danke ich für die Einführung in die Arbeit mit dem ZPES-Stämmen sowie für die Bereitstellung einiger Materialien.

Für fachliche Diskussionen bedanke ich mich bei Dr. Dirk Bumann, Dr. Toni Aebischer, Dr. Bernadette Lucas und Dr. Jan Koesling. Für die Unterstützung bei der Mikroskopie danke ich Dr. Volker Brinkmann. Dr. Vytautas Naktinis danke ich für die Bereitstellung des wertvollen HBsAg-Proteins sowie Dr. Rainer Ulrich für die Vermittlung des Kontaktes. Dörte Radke danke ich für das LLO-Lyseprotokoll sowie den fachlichen Austausch. Sehr dankbar bin ich Annette Dietrich ich für die exzellente Betreuung der Versuchstiere und die vielen Butabnahmen. Dr. Anne-Marit Sponaas und Stephan Weber danke ich für die Unterstützung bei den CTL-Assays.

Schließlich möchte ich allen sehr herzlich danken, die mich auf meiner Odyssee durch die Labors am MPI für Biologie in Tübingen, in der Berliner Monbijoustrasse, am Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin in Berlin-Marienfelde und am neuen MPI für Infektionsbiologie in Berlin-Mitte unterstützend und freundschaftlich begleitet haben.

Für das kritische Lesen dieser Arbeit möchte ich Dr. Peter Löser sehr herzlich danken.

An dieser Stelle denke ich in Liebe und Dankbarkeit an meine Eltern.

**Lebenslauf****Persönliches**

Name Holger Lößner  
Geburtsdatum 04.09.1969  
Geburtsort Berlin

**Schule**

1988 Abitur, Erweiterte Oberschule in Berlin-Lichtenberg

**Wehrdienst**

1988 - 1990 NVA, Chemische Abwehr

**Studium**

1990-1992 Grundstudium im Fach Biochemie an der Humboldt-Universität zu Berlin

1992-1993 Gaststudent am Department of Biochemistry, University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST), England

1993-1994 Fulbright-Stipendiat am Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens, USA

1994-1995 Abschluss des Hauptstudiums an der Humboldt-Universität zu Berlin

1995-1996 Diplomarbeit in der AG Zellteilungsregulation und Gensubstitution des Max-Planck-Instituts für Biochemie am MDC in Berlin bei Prof. Dr. Michael Strauss, betreut von Dr. Volker Sandig, Thema : Eignung des latenten Replikons des Epstein-Barr-Virus für die Integration in lebergerichtete Gentherapievektoren

1996-2002 Doktorand am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen und am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin bei Prof. Dr. Thomas F. Meyer, Thema : Autolytische Salmonellen als Vektoren für die orale genetische Vakzinierung

**Beruf**

seit Mai 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Molekulare Immunologie an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig bei Dr. Siegfried Weiß

### **Eidstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Holger Lößner

Braunschweig, den 20. Juni 2003